Aus dem Institut für Biochemie
am Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor:
Professor Dr. Volker A. Erdmann

IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES ZENTRALEN NICOTINISCHEN ACETYLCHOLINREZEPTORS IM RATTENHIRN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
CHRISTINE MONIKA REULECKE
aus Bromberg
1985

DIEV. LEXIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0067

Aus dem Institut für Biochemie am Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin,
Geschäftsführender Direktor:
Professor Dr. Volker A. Erdmann

Identifizierung und Charakterisierung des zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptors in Rattenhirn

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christine Monika Reulecke
aus Bromberg

Referent: Professor Dr. F. Körber

Korreferent: Professor Dr. H. Kewitz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. April 1985

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Neurochemie von Professor Dr. rer. nat. Ferdinand Hucho am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin.

Für viele Anregungen und fruchtbare Diskussionen danke ich Herrn Professor Hucho und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.

Herrn Professor Dr. med. F. Körber, Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin, möchte ich für seine Beratung und Hilfe danken.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einführung	6
1.1	Acetylcholin als Transmitter im Nervensystem	6
1.2	Der nicotinische Acetylcholinrezeptor im Zentralen Nervensystem	8
1.3	Neuropeptide im Gehirn	13
2	Ziel der Arbeit	15
3	Eigene Experimente	17
3.1	Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an Rattenhirnhomogenat	17
3.1.1	Einige Überlegungen und Anmerkungen zu den experimentellen Methoden	17
3.1.2	Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an cholinerge Rezeptoren	22
3.1.3	Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an nicotinisch-cholinerge Rezeptoren	24
3.1.4	Kinetik der [^{3}H]Acetylcholin-Bindung	28
3.1.5	Diskussion	30
3.2	Einige pharmakologische Eigenschaften des zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptors	34
3.2.1	d-Tubocurarin	34
3.2.2	α-Bungarotoxin	37
3.2.3	Arecolin	37

		Seite
3.3	Substanz P als Neuromodulator am zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor? Ein Modellversuch	39
3.3.1	Einige Überlegungen und Anmerkungen zu den experimentellen Methoden	39
3.3.2	Konzentrationsabhängige Bindung von [^{3}H]Acetylcholin in Anwesenheit von Substanz P	41
3.3.3	Zeitabhängige Bindung von [^{3}H]Acetylcholin in Anwesenheit von Substanz P	41
3.3.4	Diskussion	42
4	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
5	Methoden	45
5.1	Präparation des Rattenhirnhomogenates	45
5.2	Proteinbestimmung	46
5.3	Synthese von [^{3}H]Acetylcholin	46
5.4	Zentrifugationstest zur quantitativen Bestimmung des bindungsfähigen [^{3}H]Acetylcholins	47
5.5	Filtrationstest	49
5.6	Bestimmung der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) und der Dissoziationskonstanten (K_D)	50
5.7	Inhibitionskonstante K_i	52
5.8	Filtrationstest mit Peptidase-Inhibitoren	53
5.9	Dünnschichtchromatographie von Substanz P	54
6	Literatur	56
	Lebenslauf	61

1 EINFÜHRUNG

1.1 Acetylcholin als Transmitter im Nervensystem

Acetylcholin war die erste Substanz, für die eine Funktion als Neurotransmitter im Nervensystem nachgewiesen werden konnte. 1921 postulierte Otto Loewi aufgrund seiner Versuche am Froschherzmuskelpräparat zunächst einen "Vagus"-stoff, der später von H.H. Dale und Mitarbeitern als Acetylcholin identifiziert wurde. Durch intensive Forschungsarbeit ist die cholinerge Neurotransmission heute das am besten untersuchte System chemischer Signalübertragung in Nervensystemen vieler verschiedener Tierarten sowie des Menschen, und Acetylcholin gilt als Prototyp eines Neurotransmitters.

Im Nervensystem höherer Vertebraten findet man cholinerge Transmission im peripheren motorischen Nervensystem, in den Ganglien des sympathischen und parasympathischen Nervensystems, an den peripheren Synapsen des parasympathischen Nervensystems sowie im Zentralen Nervensystem. Pharmakologische Untersuchungen ergaben, daß die Effekte des Acetylcholins in den verschiedenen Systemen entweder durch Nicotin (Tabakalkaloid) oder durch Muscarin (Giftstoff des Fliegenpilzes) imitiert werden können. So wirkt Nicotin agonistisch an der neuromuskulären Endplatte und an den sympathischen und parasympathischen Ganglien, Muscarin dagegen als Agonist an den peripheren Synapsen der postganglionären parasympathischen Neuronen. Man spricht deshalb von nicotinischen bzw. muscarinischen Wirkungen, Synapsen und Acetylcholinrezeptoren. Diese Unterscheidung kann bisher als sinnvoll gelten, da sich die nicotinischen und muscarinischen Synapsen in den bisher untersuchten Systemen anscheinend nicht nur pharmakologisch, sondern auch physiologisch und biochemisch gegeneinander abgrenzen lassen.

Der unter pharmakologischen, physiologischen, biochemischen und immunologischen Gesichtspunkten am besten untersuchte

Neurotransmitterrezeptor ist der nicotinische Acetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte. Lange Zeit war die Untersuchung der neuromuskulären Erregungsübertragung eine Domäne der Elektrophysiologen. Durch verschiedene günstige experimentelle Bedingungen rückt jetzt auch die Möglichkeit einer Aufklärung der Wirkungsmechanismen auf molekularer Ebene näher. Für den peripheren nicotinischen Acetylcholinrezeptor gibt es neben einer Reihe spezifisch wirkender Substanzen die α-Neurotoxine aus Schlangengiften (z.B. α-Bungarotoxin aus "Bungarus multicinctus"), die mit hoher Affinität und Spezifität an diesen Rezeptor binden und zur Identifizierung und Reinigung des Rezeptorproteins genutzt werden (1).

Eine reiche Quelle eines nicotinischen Acetylcholinrezeptors ergab sich mit der Verwendung des elektrischen Gewebes der elektrischen Fische "Electrophorus electricus" und "Torpedo". Die Elektrocyten oder Elektroplaques dieses Gewebes stammen entwicklungsbiologisch von Skelettmuskelzellen ab und enthalten in sehr hohen Konzentrationen nicotinische Acetylcholinrezeptoren, die große Ähnlichkeit mit dem nicotinischen Acetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte haben (1). So nutzt man das gereinigte Rezeptorprotein des elektrischen Gewebes immunologisch zur Herstellung spezifischer, gegen den Muskelrezeptor gerichteter monoklonaler Antikörper und zur Induzierung der experimentellen Myasthenia gravis im Tierversuch (2). Wegen dieser Ähnlichkeit wird der nicotinische Acetylcholinrezeptor des elektrischen Gewebes als Modell für den nicotinischen Acetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte und darüber hinaus für einen mit einem Ionenkanal gekoppelten Rezeptortyp angesehen und ist Gegenstand intensiver Forschung zur Aufklärung von Struktur und Funktion des Rezeptormakromoleküls (1,3,4).

Die experimentellen Bedingungen im Zentralen Nervensystem sind ungleich ungünstiger, so daß Nachweis und Charakteri-

sierung cholinerger Neurotransmission im Gehirn auf erhebliche Schwierigkeiten stoßen. Es gibt Konzentrationsbestimmungen von Acetylcholin und Enzymaktivitätsbestimmungen der synthetisierenden Cholin-Acetyltransferase und der abbauenden Acetylcholinesterase die zeigen, daß Acetylcholin anscheinend in unterschiedlichem Ausmaß in allen Hirnregionen vorhanden ist (5). Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen sprechen für eine Neurotransmitterfunktion auch im Gehirn (6). Da auch Nicotin und Muscarin im Zentralen Nervensystem wirksam sind und in ihrer Wirkung anscheinend nicht interferieren, liegt es nahe anzunehmen, daß die Unterscheidung von muscarinischen und nicotinischen Acetylcholinrezeptoren auch auf das Zentrale Nervensystem übertragen werden kann. Der muscarinische Acetylcholinrezeptor des Zentralen Nervensystems ist dank bekannter hochaffiner Liganden relativ gut untersucht (7). Dagegen ist über den zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor bisher noch wenig bekannt. Der gegenwärtige experimentelle Stand soll im folgenden zusammengefaßt werden.

1.2 Der nicotinische Acetylcholinrezeptor im Zentralen Nervensystem

Nicotin bewirkt bei systemischer Applikation eine Vielzahl von Veränderungen im Organismus entsprechend seiner Wirkung an den genannten nicotinisch-cholinergen Synapsen (8,9). Die Wirkungen im Gehirn werden zum Teil durch periphere Afferenzen induziert; durch geeignete Versuchsanordnung konnten jedoch auch spezifische Wirkungen im Gehirn abgegrenzt werden, z.B. Stimulierung der Atmung (8,9), Aktivierung im EEG, Blutdruckänderungen und Ausschüttung von Vasopressin und Ocytocin (6).

Erste Versuche, spezifische nicotinisch-cholinerge Bindung im Gehirn mit [^{3}H]d-Tubocurarin (10) und [^{3}H]Nicotin (11) nachzuweisen, verliefen aufgrund experimenteller Schwierig-

keiten wenig erfolgreich. Da sich die α-Neurotoxine, darunter besonders das α-Bungarotoxin, als so ausgezeichnete Mittel zur Charakterisierung des peripheren nicotinischen Acetylcholinrezeptors erwiesen hatten, arbeiteten seit ca. 1970 zahlreiche Arbeitsgruppen an der Reinigung und Charakterisierung einer α-Bungarotoxin-Bindungsstelle im Gehirn unter der Hypothese, daß es sich bei dieser Bindungsstelle um den zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor handelt.

Für diese Hypothese sprechen vor allem biochemische und pharmakologische Untersuchungsergebnisse. So gibt es z.B. zwischen dem zentralen α-Bungarotoxin-Bindungsprotein und dem Acetylcholinrezeptorprotein aus Elektrocyten und Muskelzellen Übereinstimmungen bezüglich der Molekulargewichte einzelner Untereinheiten, des Isoelektrischen Punktes, des Sedimentationskoeffizienten, des Lectin-Bindungsspektrums sowie des Vorhandenseins und der Eigenschaften einer Disulfidbrücke (12,13,14,15). Auch verdrängen nicotinisch-cholinerge Agonisten (Nicotin, Acetylcholin) und Antagonisten (d-Tubocurarin, Gallamin) α-Bungarotoxin kompetitiv an seiner Bindungsstelle im Gehirn (12,16). Dagegen sind die Ergebnisse aus anatomischen und immunologischen Untersuchungen widersprüchlich. Zwar konnten in allen Hirnregionen mit nachgewiesener cholinerger Enzymaktivität (Cholin-Acetyltransferase und Acetylcholinesterase) α-Bungarotoxin-Bindung gezeigt werden, doch fand sich α-Bungatoxin-Bindung auch extrasynaptisch und extracholinerg (z.B. in der Area "X" des Rattenhippocampus) (12). Und eine Immunopräzipitation des α-Bungarotoxin-Bindungsproteins mit Antiseren gegen das gereinigte Rezeptorprotein aus elektrischem Gewebe wird von einigen Arbeitsgruppen als signifikant oder sogar hoch, von anderen als gering oder gar nicht vorhanden beschrieben (17,18,19).

Das stärkste Argument gegen die Hypothese, daß es sich bei der α-Bungarotoxin-Bindungsstelle um den zentralen

nicotinischen Acetylcholinrezeptor handelt, ergibt sich aus physiologischen Untersuchungen. Es konnte nur in einzelnen von zahlreichen untersuchten nicotinisch-cholinergen Versuchssystemen der zu fordernde Antagonismus von α-Bungarotoxin gezeigt werden, z.B. im optischen Tectum der Kröte "Bufo marinus" (20) und des Goldfisches (21). In den meisten anderen Versuchssystemen mit nicotinisch-cholinerger Neurotransmission fand sich keine Blockierung des physiologischen Effektes durch α-Bungarotoxin.

Obwohl in der Literatur noch immer vielfach die α-Bungarotoxin-Bindungsstelle im Gehirn mit dem zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor gleichgesetzt wird, verstärkt sich in letzter Zeit aufgrund neuerer experimenteller Ergebnisse die Tendenz, von dieser Gleichsetzung abzurücken (13,22).

Wohl wegen dieser Beweisschwierigkeiten wird seit einiger Zeit wieder versucht, den zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor mit [^{3}H]Nicotin bzw. dem physiologischen Liganden [^{3}H]Acetylcholin (in Gegenwart von Atropin zur Blockierung des muscarinischen Acetylcholinrezeptors) nachzuweisen, zumal diese Substanzen inzwischen mit ausreichend hoher spezifischer Radioaktivität zur Verfügung stehen bzw. sythetisiert werden können. Die vier Arbeitsgruppen, die bisher detaillierte Ergebnisse vorgelegt haben, kommen bezüglich der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) und der Dissoziationskonstanten (K_D) (siehe Methoden 5.6) unter Berücksichtigung der Unterschiede bei der Hirnpräparation, der verwendeten Liganden, der Trennungsmethoden und anderer Versuchsbedingungen zu relativ guter Übereinstimmung (siehe Tabelle 1).

	B_{max} fmol/mg Protein	B_{max} fmol/mg Gewebe	K_D nM
Abood et al., 1980 (23) [^{3}H]Nicotin Rattenhirnhomogenat	20		6
Abood et al., 1983 (24) [^{3}H]Nicotin Rattenhirnhomogenat	40		5
Romano und Goldstein, 1980 (25) [^{3}H]Nicotin Rattenhirnhomogenat		3,2 (2,7-6,1)	28 (20-89)
Schwartz et al., 1982 (26) [^{3}H]Acetylcholin Rattenhirnhomogenat	67,2 $\pm$ 3,0	4,6 $\pm$ 0,1	12,3 $\pm$ 0,8
Marks und Collins, 1982 (27) [^{3}H]Nicotin Mäusehirnhomogenat	88,2 $\pm$ 6,7		58,6 $\pm$ 15,0

Tab. 1: Bisher veröffentlichte Bindungscharakteristika für den zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor.

Von Marks und Collins (27) wurde zum Vergleich die maximale Bindungskapazität für α-Bungarotoxin mit 22,7 $\pm$ 1,8 fmol/mg Protein bestimmt und beträgt somit etwa den vierten Teil der mit [^{3}H]Nicotin unter gleichen Versuchsbedingungen bestimmten maximalen Bindungskapazität (siehe Tabelle 1).

Romano und Goldstein (25) beschreiben eine zweite, niederaffine Bindung von [^{3}H]Nicotin mit B_{max}= 10,4 fmol/mg Gewebe und K_D= 460 nM. Hinweise auf eine zweite, niederaffine Bindung ergaben sich auch aus zwei schon früher veröffentlichten Arbeiten (28,29). Marks und Collins (27) finden bei 4° C Inkubationstemperatur eine zusätzliche, niederaffine Bindung, die sie aber als unspezifischen

Temperatureffekt werten. Schwartz et al. (26) und Abood et al. (23,24) beschreiben nur eine Bindungsstelle, insofern finden sich unterschiedliche Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen.

Übereinstimmung ergibt sich aus den Verdrängungsexperimenten, mit denen die kompetitiven Eigenschaften zahlreicher bekannter nicotinisch-cholinerger Agonisten und Antagonisten an der mit [^{3}H]Nicotin bzw. [^{3}H]Acetylcholin identifizierten Bindungsstelle bestimmt wurden (23 - 27). Dabei zeigte sich in allen Arbeiten, daß Agonisten wie Cytisin, Lobelin, Tetramethylammonium, 1,1-Dimethyl-4-phenylpiperaziniumiodid (DMPP) eine hohe Affinität zur Bindungsstelle haben, d.h. [^{3}H]Nicotin bzw. [^{3}H]Acetylcholin schon bei relativ niedrigen Konzentrationen aus der Bindung verdrängen. Dagegen haben die bekannten nicotinisch-cholinergen Antagonisten wie α-Bungarotoxin, d-Tubocurarin, Gallamin, Mecamylamin, Hexamethonium an der zentralen nicotinisch-cholinergen Bindungsstelle nur geringe kompetitive Eigenschaften.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine spezifische, sättigbare Bindungsstelle für [^{3}H]Nicotin bzw. [^{3}H]Acetylcholin (in Anwesenheit von Atropin) im Gehirn höherer Vertebraten (Ratte, Maus) nachgewiesen werden konnte, bei der es sich höchstwahrscheinlich um den nicotinischen Acetylcholinrezeptor des Gehirns handelt. Diese Bindungsstelle zeigt eine hohe Affinität für nicotinisch-cholinerge Agonisten, aber nur geringe Affinität für die bekannten nicotinisch-cholinergen Antagonisten. Unterschiedlich wird die Frage einer weiteren, niederaffinen Bindungsstelle diskutiert.

Eine Verbesserung der experimentellen Bedingungen könnte zu entscheidenden Fortschritten beitragen. Ein erster Versuch zur Reinigung des Bindungsproteins durch Abood et al. (24) zeigt noch kein überzeugendes Ergebnis, da sich zwischen dem aus der Elektrophorese für das angeb-

liche Rezeptorprotein bestimmten Molekulargewicht und dem aus der für [^{3}H]Nicotin angegebenen maximalen Bindungskapazität (mol/mg Protein) unter der Annahme der behaupteten Homogenität und einer Bindungsstelle pro Proteinmolekül bestimmbaren Molekulargewicht eine Diskrepanz von 10^3 ergibt. Grundsätzlich sollte es aber möglich sein, das Rezeptorprotein anzureichern. Wünschenswert wäre auch die Entdeckung eines hochaffinen und spezifischen Antagonisten für den zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor.

.3 Neuropeptide im Gehirn

Im Gehirn von Säugetieren läßt sich immunologisch eine Vielzahl von Peptiden nachweisen, für deren Funktion es bisher keine einheitliche Hypothese gibt (30 - 34). Die Peptide des hypothalamisch- hypophysären Systems betrachtete man zunächst als Neurohormone, inzwischen wurden diese Peptide aber auch in anderen Hirnregionen und im peripheren Nervensystem gefunden, eine Verteilung, die mit der bisher angenommenen Funktion nicht erklärt werden kann (30,31). Andererseits wurden biologisch aktive Neuropeptide des Gastrointestinaltraktes in Gehirn und Rückenmark identifiziert. Opiat-Peptide und Substanz P wurden ubiquitär im Nervensystem gefunden. Insgesamt ergibt sich ein verwirrendes Bild, so daß aus der regionalen Verteilung nicht auf eine spezifische Funktion geschlossen werden kann.

Vielmehr scheint es so zu sein, daß Neuropeptide entsprechend ihrer Zielzelle als Neurohormone, Neurotransmitter oder Neuromodulatoren wirken können. Für zahlreiche Peptide wurden bereits mehrere dieser Funktionen beschrieben, z.B. für Enkephaline, Substanz P, Thyroliberin, Somatostatin und Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) (30,34).

Neurohormone benötigen keinen direkten Kontakt zwischen der ausschüttenden Zelle und der Zielzelle, sie erreichen

ihren Wirkort in der Regel über den Blutkreislauf. Eine solche Funktion ist z.B. - neben anderen - für Thyroliberin und Somatostatin nachgewiesen. Eine hormonähnliche Wirkung von Peptiden im Gehirn selbst im Sinne einer Koordination der Erregbarkeit größerer Neuronenpopulationen wird vermutet (32).

Von einem Neurotransmitter ist zu fordern, daß er für sich allein über spezifische Rezeptoren einen postsynaptischen Effekt auslösen kann. Die Enkephaline (30,35) und Substanz P (36 - 40) scheinen in einigen Versuchssystemen Neurotransmittereigenschaften zu haben.

Als Neuromodulatoren bezeichnet man Substanzen, die den durch einen Neurotransmitter bewirkten postsynaptischen Effekt verändern, diesen für sich allein aber nicht auslösen können. In letzter Zeit werden in zunehmendem Ausmaß Nervenzellen identifiziert, die in ihren synaptischen Endigungen neben dem "klassischen" Neurotransmitter auch ein oder mehrere Neuropeptide enthalten, im Gehirn z.B. Dopamin mit Cholecystokinin (CCK), Noradrenalin mit Enkephalin, Serotonin mit Substanz P und Thyroliberin (31,34). Es scheint so zu sein, daß sich eine Neuronenpopulation mit einem "klassischen" Neurotransmitter in Subpopulationen entsprechend koexistenter Neuropeptide unterteilt (34). Von diesen Peptiden nimmt man eine neuromodulatorische Funktion an, in der Regel scheinen die koexistenten Peptide die postsynaptische Antwort zu verstärken (34). Als Wirkungsmechanismen der Neuromodulation kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht (34). So könnte über präsynaptische Rezeptoren die Ausschüttung des Neurotransmitters beeinflußt werden, das Peptid könnte die Affinität und Bindungskinetik des Neurotransmitters am postsynaptischen Rezeptor verändern, Abbau oder Wiederaufnahme des Neurotransmitters könnten durch das Peptid reguliert werden, um nur einige Möglichkeiten zu nennen. Für diese Annahmen gibt es jedoch bisher keine experimentellen Beweise.

Mit der Entdeckung der Peptide im Gehirn hat sich ein Forschungsgebiet eröffnet, dessen Ergebnisse möglicherweise zu Änderungen und Neuformulierung von Grundvorstellungen über die chemische Signalübertragung im Nervensystem führen werden.

2 ZIEL DER ARBEIT

Es sollte ein praktikables Versuchssystem zur Identifizierung und Charakterisierung nicotinisch-cholinerger Bindung im Gehirn eines höheren Vertebraten entwickelt werden. In diesem System sollten

- Bindungscharakteristika wie maximale Bindungskapazität (B_{max}) und die Dissoziationskonstante (K_D) bestimmt werden,
- das Verhältnis von nicotinisch-cholinerger Bindung zu muscarinisch-cholinerger Bindung erfaßt werden,
- die Frage nach einer zweiten, niederaffinen Bindung geprüft werden,
- die Bindungskinetik, d.h. die Bindung in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden.

Weiterhin interessierten einige spezielle pharmakologische Eigenschaften der nicotinisch-cholinergen Bindung im Gehirn:

Da die bisher veröffentlichten Verdrängungsexperimente (siehe 1.2) mit cholinergen Agonisten und Antagonisten alle bei [^{3}H]Nicotin- bzw. [^{3}H]Acetylcholinkonzentrationen unter 50 nM, also im Bereich der hochaffinen Bindung, ausgeführt wurden, sollte für den kompetitiven Antagonisten d-Tubocurarin die Kompetition mit [^{3}H]Acetylcholin im Bereich hoch- und niederaffiner Bindung gezeigt werden.

Wegen der anhaltenden Diskussion über die Frage, ob es sich bei der α-Bungarotoxin-Bindungsstelle im Zentralen Nervensystem um den nicotinischen Acetylcholinrezeptor

handelt, und weil die Kompetition mit [^{3}H]Acetylcholin bisher nur von Schwartz et al. (26) im Bereich hochaffiner Bindung verneint wurde, sollte hier eine mögliche Kompetition von α-Bungarotoxin im Bereich hoch- und niederaffiner Bindung geprüft werden.

Die kompetitiven Eigenschaften des cholinergen Agonisten Arecolin, der in den bisher veröffentlichten Verdrängungsexperimenten nicht aufgeführt ist, sollten im Konzentrationsbereich der hochaffinen Bindung untersucht werden. Insbesondere sollten die Affinitäten zum muscarinisch-cholinergen und nicotinisch-cholinergen Rezeptor miteinander verglichen werden.

Schließlich sollte ein Versuchssystem zur Untersuchung einer möglichen Neuromodulation am zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor durch ein Neuropeptid entwickelt werden und zwar unter dem Gesichtspunkt eines Einflusses auf die Affinität oder die Bindungskinetik des physiologischen Liganden Acetylcholin in Gegenwart eines Neuropeptids. Wie in der Einleitung erwähnt (siehe 1.3), ist Substanz P im Zentralen Nervensystem ubiquitär vorhanden (36,39), seine biochemischen Eigenschaften sind recht gut bekannt, und es gibt Hinweise für modulatorische Eigenschaften in verschiedenen Systemen (34,41). Es sollte deshalb ein exemplarischer Versuch mit Substanz P als möglichem Neuromodulator am nicotinischen Acetylcholinrezeptor gemacht werden.

3 EIGENE EXPERIMENTE

3.1 Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an Rattenhirnhomogenat

3.1.1 Einige Überlegungen und Anmerkungen zu den experimentellen Methoden

Für den Nachweis spezifischer Bindung im Bindungstest gibt es drei wichtige Gesichtspunkte,

- rezeptorhaltige Membranpräparation,
- radioaktiv markierter Ligand,
- Trennung von gebundenem und freiem Liganden,

die im folgenden allgemein und speziell für die Fragestellung dieser Arbeit diskutiert werden sollen.

In den meisten Bindungsexperimenten wird die Bindung eines Liganden an das in die Membran integrierte Rezeptorprotein gemessen, das bedeutet, daß der eingesetzte Ligand auch an andere Membrankomponenten binden kann. Diese sogenannte "unspezifische Bindung" ist in der Regel von niedriger Affinität und zeigt bei den üblicherweise eingesetzten Ligandenkonzentrationen eine lineare Beziehung zwischen Bindung und Ligandenkonzentration. Die im Bindungsexperiment gemessene Gesamtbindung setzt sich also zusammen aus spezifischer Rezeptorbindung und unspezifischer Bindung an andere Komponenten der eingesetzten Membranpräparation (Abb. 1). Die Messung der unspezifischen Bindung erfolgt in Gegenwart eines großen Überschusses an nicht radioaktiv markiertem Liganden oder eines anderen kompetitiven Liganden (Konzentrationen ca. K_D x 100 oder mehr), so daß der radioaktiv markierte Ligand nicht spezifisch an den Rezeptor binden kann. Die Differenz zwischen unspezifischer Bindung und Gesamtbindung ergibt den Anteil der spezifischen Bindung (Abbildung 1).

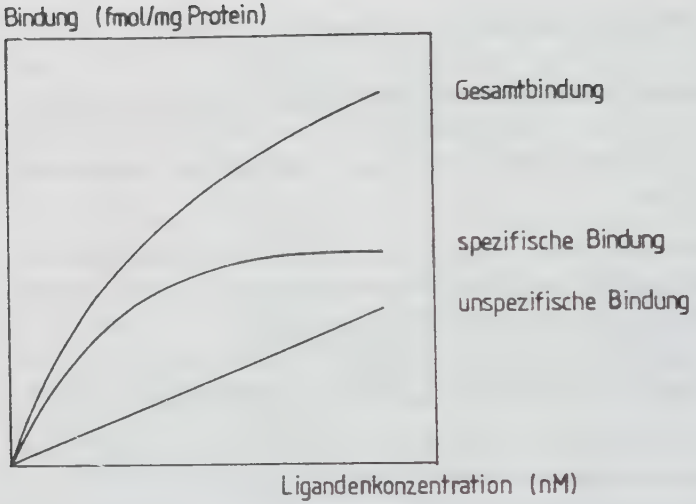

Abb. 1: Schema eines Bindungstests

Je reiner der Rezeptor vorliegt, desto geringer wird der Anteil der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung. Umgekehrt kann bei sehr niedrigen Rezeptorkonzentrationen der Anteil der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung so groß werden, daß sich die unspezifische Bindung nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit erfassen läßt. Dieses Problem ergibt sich beim Nachweis spezifischer Rezeptorbindung im Zentralen Nervensystem, denn die Konzentration der Neurotransmitterrezeptoren in der gesamten Hirnsubstanz ist sehr niedrig (ca. 10^{-10} - 10^{-12} mol/g Gewebe). Eine geeignete Methode zur Anreicherung nicotinisch-cholinerger Rezeptoren aus Hirnhomogenaten ist bisher nicht bekannt, ein erster Versuch wurde kürzlich von Abood et al. (24) veröffentlicht (siehe 1.2). Für verschiedene experimentelle Untersuchungen wird die Synaptosomenpräparation nach Whittaker (42) verwendet, bei der synaptische Endigungen angereichert werden. Da Schwartz et al. (26) aber nur ca. 10% mehr an spezifischer Bindung in dieser Fraktion gegenüber einem Rohhomogenat angegeben haben, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, die Bindungsexperimente

mit einer Synaptosomenfraktion auszuführen. Es wurde ein Rattenhirnhomogenat nach der Methode von Schwartz et al. (26) verwendet (siehe Methoden 5.1). Unter diesen Bedingungen war der Anteil an unspezifischer Bindung an der Gesamtbindung relativ hoch (50 - 75%).

Daraus ergab sich die Konsequenz, ein möglichst starkes Signal verwenden zu müssen, d.h. einen hochaffinen radioaktiv markierten Liganden mit hinreichend hoher spezifischer Radioaktivität (mindestens im Bereich TBq/mmol), damit die Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung, d.h. die spezifische Bindung, deutlich größer ist als der Bereich der Streuung der Meßwerte.

Fast alle Bindungsexperimente am zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor wurden mit [^{3}H]Nicotin ausgeführt, das in ausreichend hoher spezifischer Radioaktivität (ca. 2,5 TBq/mmol) erhältlich ist. Erste eigene Experimente wurden deshalb ebenfalls mit [^{3}H]Nicotin ausgeführt. Dabei treten aber verschiedene Probleme durch Radiolyse und einer scheinbar spezifischen Bindung an Filtermaterialien auf. Romano und Goldstein (25) haben geeignete Lagerungsbedingungen und Reinheitskontrollen mittels Dünnschichtchromatographie und High Performance Liquid Chromatography (HPLC) für [^{3}H]Nicotin beschrieben, ebenso eine Verminderung der Filterbindung durch Vorbehandlung mit 0,1% Polylysin. Für eine routinemäßige Anwendung sind aber zumindest die Reinheitskontrollen relativ aufwendig. Die spezifische Radioaktivität des käuflich erhältlichen [^{3}H]Acetylcholins ist mit GBq/mmol für zuverlässige Experimente in Hirnhomogenaten zu niedrig (11). Schwartz et al. (26) beschreiben eine Methode, käufliches [^{3}H]Cholin hoher spezifischer Radioaktivität (ca. 3 TBq/mmol) zu [^{3}H]Acetylcholin zu synthetisieren. Diese Methode wurde in den hier vorgestellten Experimenten angewandt (siehe Methoden 5.3).

Anders als bei Schwartz et al. (26) wurde die Reinheit des synthetisierten [^{3}H]Acetylcholins durch einen Bindungstest bestimmt. Acetylcholin bindet mit hoher Affinität und Spezifität an die Acetylcholinrezeptor-reichen Membranvesikel von "Torpedo"-Elektroplaques (1,43,44). In dem Labor, in dem die hier beschriebenen Experimente ausgeführt wurden, besteht das Protein der routinemäßig präparierten Membranvesikel zu ca. 80% aus nicotinischem Acetylcholinrezeptor. Im Bindungstest (Ultrazentrifugation) ergibt sich unter Gleichgewichtsbedingungen eine Sättigungskurve, eine unspezifische Bindung ist praktisch nicht nachweisbar. Diese Eigenschaft wurde genutzt, den Anteil nicht bindungsfähiger Radioaktivität am synthetisierten [^{3}H]Acetylcholin durch einen Bindungstest (siehe Methoden 5.4) mit "Torpedo"-Membranvesikeln routinemäßig zu bestimmen (Abb. 2).

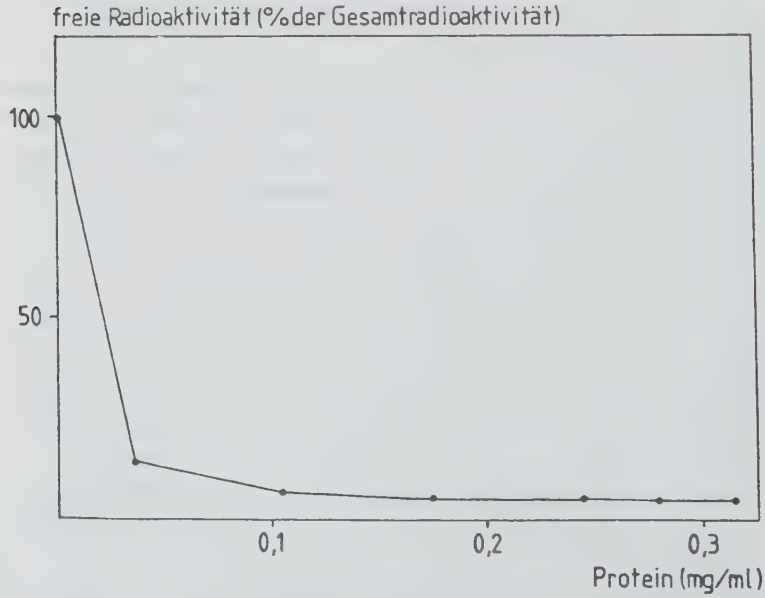

Abb. 2: Freie Radioaktivität als % der Gesamtaktivität im Bindungstest von synthetisiertem [^{3}H]Acetylcholin an "Torpedo"-Membranvesikel. Eingesetzte [^{3}H]Cholinkonzentration hier 39 nM, nicht bindungsfähiger Anteil hier 5%, bindungsfähige [^{3}H]Acetylcholinkonzentration also 37,1 nM.

Da nicht die Bindungskurve interessierte, sondern der Anteil der auch bei erheblichem Überschuß an Rezeptor ungebunden bleibenden Radioaktivität, wurde die Bindung im Sättigungsbereich gemessen. Bei der ungebunden bleibenden Radioaktivität dürfte es sich um einen geringen Anteil unverestert bleibenden [^{3}H]Cholins handeln bzw. um Spaltprodukte (siehe Methoden 5.4).

Es stand somit ein Ligand mit hinreichend hoher spezifischer Radioaktivität zur Verfügung, dessen Reinheit routinemäßig ohne größeren Aufwand überprüft werden konnte.

Zur quantitativen Bestimmung des spezifisch gebundenen Liganden muß eine Trennung von freiem und gebundenem Liganden erfolgen. Die wichtigsten Methoden - Gleichgewichtsdialyse, Zentrifugation, Filtration - haben verschiedene Vor- und Nachteile (45). Für die Fragestellung dieser Arbeit eignet sich am besten die Filtrationsmethode, bei der der gebundene Ligand durch einen geeigneten Filter abgetrennt und durch Nachwaschen Reste von freiem Liganden entfernt werden (siehe Methoden 5.5). Die Affinität des radioaktiv markierten Liganden zum Rezeptor muß allerdings hoch genug sein, damit während der Filtrationszeit nicht zuviel an spezifisch gebundenem Liganden wieder abdissoziiert. Bennett (45) gibt für einen Verlust von höchstens 10% folgende Richtwerte an:

K_D des Liganden:	Filtrationszeit:
10^{-9} M	1,7 min
10^{-8} M	10 s
10^{-7} M	0,1 s

In Kenntnis einer K_D für [^{3}H]Acetylcholin von ungefähr 13 nM (26) und einer unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen notwendigen Filtrationszeit von ca. 15 - 20 s war eventuell mit mehr als höchstens 10% Verlust an spezifischer Bindung zu rechnen. Die Bindungsexperimente wurden deshalb bei 4° C mit einer längeren Inkubationszeit (60 min)

zur Einstellung des Gleichgewichts ausgeführt (siehe Methoden 5.5) unter dem Gesichtspunkt einer Verlangsamung der Assoziations- und Dissoziationskinetik bei niedrigen Temperaturen (45,46).

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß alle Bindungsexperimente unter "Desensitivierungsbedingungen" ausgeführt wurden. Beim peripheren nicotinischen Acetylcholinrezeptor gibt es neben dem aktiven und inaktiven einen "desensitivierten" Zustand des Rezeptors, der durch eine erhöhte Affinität für Agonisten bei geschlossenem Ionenkanal charakterisiert ist (1). Die "Desensitivierung" ist abhängig von Konzentration und Einwirkungszeit des Agonisten. Falls es einen solchen Zustand auch beim zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor gibt, müßten aufgrund der Versuchsbedingungen die Bindungscharakteristika aus diesen Experimenten auf einen "desensitivierten" Zustand des Rezeptors bezogen werden.

3.1.2 Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an cholinerge Rezeptoren

Es sollte zunächst die Größenordnung der [^{3}H]Acetylcholinbindung an alle cholinergen Rezeptoren in Rattenhirnhomogenat bestimmt werden. Deshalb enthielt der in den anderen Experimenten verwendete Tris-HCl-Puffer (siehe Methoden 5.1) in diesem Fall kein Atropin, um den muscarinisch-cholinergen Rezeptor nicht zu blockieren. Abbildung 3 a) zeigt die Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an Rattenhirnhomogenat im Bindungstest (siehe Methoden 5.5). Die Kurve für die spezifische Bindung wurde mit dem Kurvenlineal durchgezogen. Es ist aber zu bedenken, daß die Rezeptorpopulation heterogen ist, d.h. zumindest zwei Arten cholinerger Rezeptoren, der muscarinische und der nicotinische, an der spezifischen Bindung beteiligt sind.

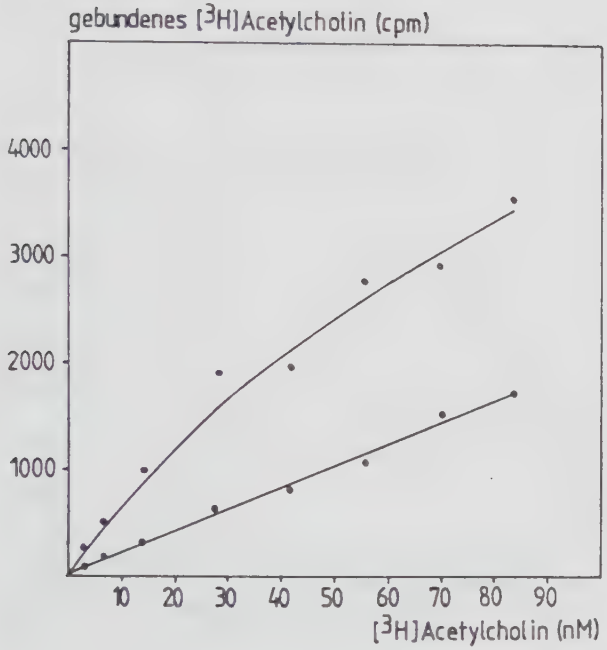

Abb. 3 a): Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an cholinerge Rezeptoren in Rattenhirnhomogenat. (-O-) Spezifische Bindung in Abwesenheit von Atropin, (-●-) unspezifische Bindung bei 100 µM Carbamylcholin (lineare Regression).

Aus der "Doppelt-reziproken Auftragung" (siehe Methoden 5.6) der spezifischen Bindung in Abbildung 3 b) ergibt sich eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 221 fmol/mg Protein bzw. 34 fmol/mg Gewebe für die gesamte cholinerge Bindung in Rattenhirnhomogenat.

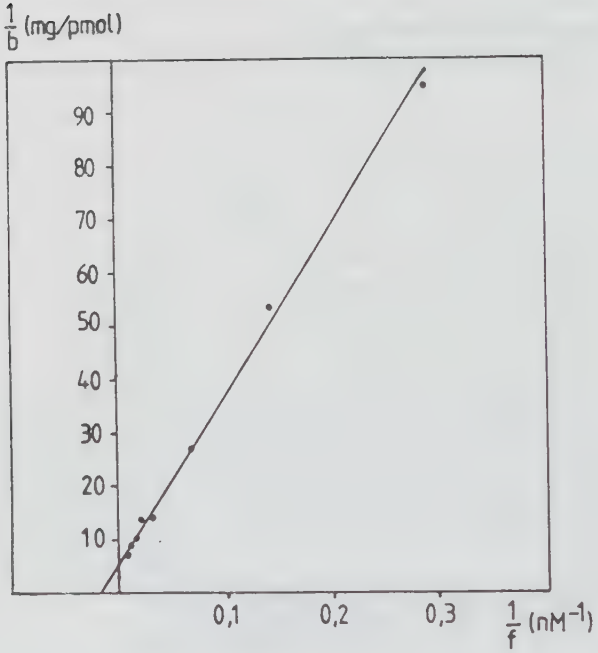

Abb. 3 b): "Doppelt-reziproke Auftragung" der spezifischen Bindung aus Abb. 3 a). f = freie [^{3}H]Acetylcholinkonzentrationen (nM), b = gebundenes [^{3}H]Acetylcholin (pmol/mg Protein).

3.1.3 Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an nicotinisch-cholinerge Rezeptoren

Zur Identifizierung der nicotinisch-cholinergen Bindung wurden die Experimente in Gegenwart von 1,5 µM Atropin ausgeführt. Bei dieser Konzentration werden die muscarinisch-cholinergen Rezeptoren blockiert, ohne daß Atropin mit der spezifischen Bindung am nicotinisch-cholinergen Rezeptor interferiert (26,48).

Eine typische Bindungskurve für [^{3}H]Acetylcholin unter den beschriebenen Bedingungen (siehe Methoden 5.5) zeigt Abbildung 4 a).

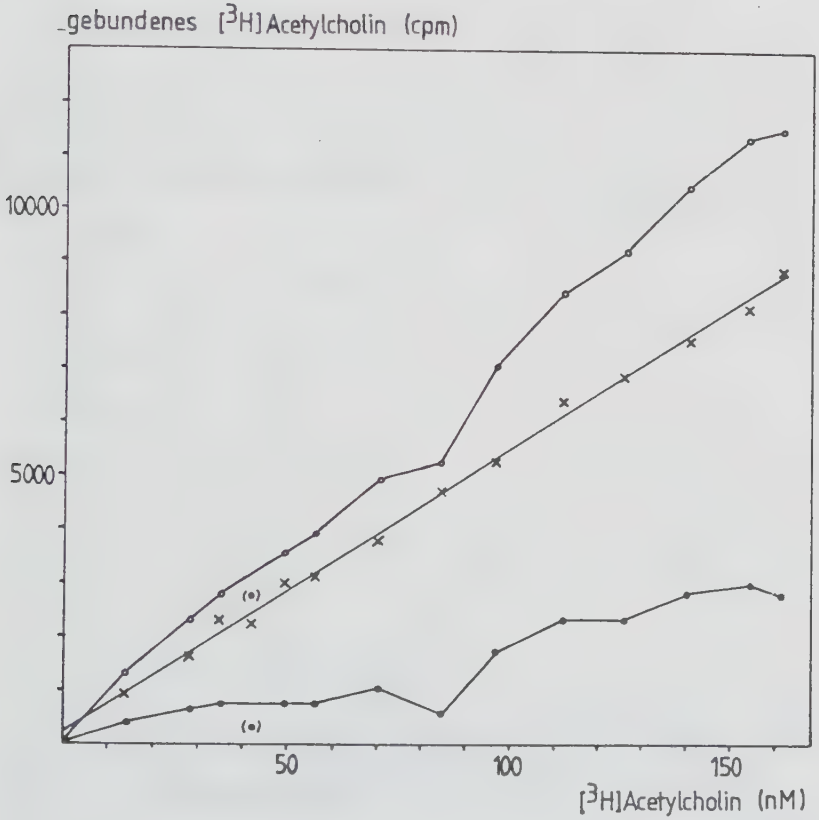

Abb. 4 a): Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an nicotinisch-cholinerge Rezeptoren in Rattenhirnhomogenat. (-●-) Spezifische Bindung, (-X-) unspezifische Bindung bei 100 µM Carbamylcholin (lineare Regression), (-o-) Gesamtbindung.

Der Kurvenverlauf ist zweiphasig mit einer hochaffinen Bindungsstelle, die in einem Konzentrationsbereich von ca. 40 - 60 nM [^{3}H]Acetylcholin eine Sättigung zeigt, und einer niederaffinen Bindungsstelle, die erst bei höheren Konzentrationen sichtbar wird. Dieser zweiphasige Verlauf wurde in fünf Bindungsexperimenten gesehen.

Die hochaffine Bindung konnte jeweils gut reproduziert werden, die Streuung der Meßwerte war relativ gering. Eine "Auftragung nach Scatchard" (siehe Methoden 5.6) für die hochaffine Bindung (Konzentrationsbereich bis 70 nM) zeigt Abbildung 4 b).

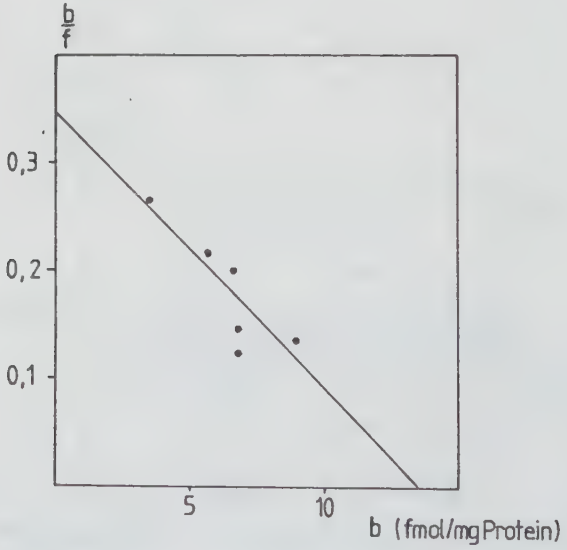

Abb. 4 b): "Auftragung nach Scatchard" für die hochaffine Bindung aus Abb. 4 b). b = gebundenes [^{3}H]Acetylcholin (fmol/mg Protein), f = freies [^{3}H]Acetylcholin (nmol/l).

Es ergeben sich daraus eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 13,5 fmol/mg Protein bzw. 2,3 fmol/mg Gewebe und

eine Dissoziationskonstante (K_D) von 39,5 nM. Eine Zusammenfassung der aus verschiedenen Experimenten errechneten Werte für B_{max} und K_D für die hochaffine Bindung zeigt Tabelle 2.

Versuchssystem	unspezifische Bindung	B_{max} fmol/mg Protein	B_{max} fmol/mg Gewebe	K_D nM
Bindungstest	100 µM Carbamylcholin	21,4	3,8	26,7
Bindungstest	100 µM Carbamylcholin	13,5	2,3	39,5
Bindungstest	1 mM d-Tubocurarin	24,6	4,0	42,4
Bindungskinetik 45 nM [^{3}H]Acetylcholin	100 µM Carbamylcholin	21,6	3,6	-
Bindungskinetik 46 nM [^{3}H]Acetylcholin	100 µM Carbamylcholin	16,0	2,7	-
Mittelwert und Standardabweichung		19,4 $\pm$ 4,5	3,3 $\pm$ 0,7	36,0 $\pm$ 8,4

Tabelle 2: Bindungscharakteristika aus verschiedenen Experimenten für die hochaffine Bindung von [^{3}H]Acetylcholin.

Für die niederaffine Bindung konnten die maximale Bindungskapazität (B_{max}) und die Dissoziationskonstante (K_D) wegen der erheblichen Streuungen der Meßwerte nicht graphisch analysiert werden. Nach Schätzungen aus den Kurvenverläufen dürfte die maximale Bindungskapazität bei ca. 6 - 10 fmol/mg Gewebe und die Dissoziationskonstante im 10^{-7} - 10^{-6} M - Bereich liegen.

In Diskussionen ergab sich die Frage, ob ein Teil der gemessenen Bindung möglicherweise eine Aufnahme von freiem [^{3}H]Cholin in Synaptosomen widerspiegelt. In einem Experiment wurde deshalb die Bindung ohne und bei 100 µM Hemicholinium, einer Substanz, die die Aufnahme von Cholin in

synaptische Endigungen blockiert, gemessen und miteinander verglichen. Dabei ergab sich kein Unterschied.

Es interessierte auch die Frage, ob und wie sich der Verlauf der Bindungskurve bei einer höheren Inkubationstemperatur ändert. Es wurde ein Bindungsexperiment mit 20 min Inkubation bei 22° C ausgeführt, die Filtration erfolgte jedoch wie sonst bei 4° C (siehe Methoden 5.5). Es zeigte sich, daß der Verlauf der Bindungskurve wiederum zweiphasig war und sich im wesentlichen nur dadurch unterschied, daß sich die niederaffine Bindung erst bei einer [^{3}H]Acetylcholinkonzentration von mehr als 90 nM zeigte. Zum Nachweis der niederaffinen Bindung bedarf es also höherer Ligandenkonzentrationen. Dies erscheint folgerichtig, da die Dissoziationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt des Filtrierens erhöht ist, die ebenfalls erhöhte Assoziationsgeschwindigkeit aber durch die plötzliche Abnahme der Ligandenkonzentration in ihrer Auswirkung auf die Bindung aufgehoben wird. Bei der hochaffinen Bindung mit niedriger Dissoziationsgeschwindigkeit wirkt sich dieser Effekt bei 22° C offensichtlich noch nicht aus. Es erscheint also sinnvoll, den in 3.1.1 diskutierten Verlust an spezifischer Bindung für die niederaffine Bindung durch die Filtrationsbedingungen durch eine niedrige Inkubationstemperatur teilweise zu kompensieren.

3.1.4 Kinetik der [^{3}H]Acetylcholin-Bindung

Zur weiteren Charakterisierung der hochaffinen und niederaffinen Bindung wurde die spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Es wurde wieder der unter Methoden 5.5 beschriebene Filtrationstest verwendet, nur wurde die Filtration in variablen Zeitabständen vorgenommen.

Für eine [^{3}H]Acetylcholinkonzentration von 46 nM, die im Sättigungsbereich der hochaffinen Bindung liegt, ergab sich die in Abb. 5 gezeigte zeitabhängige Bindungskurve.

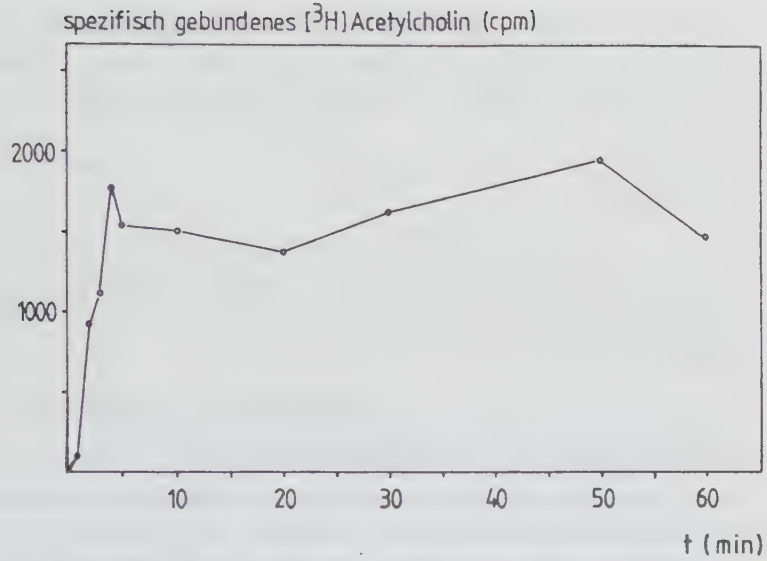

Abb. 5: Zeitabhängige spezifische Bindung von [^{3}H]Acetylcholin im Konzentrationsbereich hochaffiner Bindung (46 nM).

Die Kurve zeigt einen "overshoot" bei ca. 4 min, der auch in drei weiteren Experimenten zu sehen war. Die halbmaximale Bindung liegt bei 2 min. Wie aus dem Vergleich mit den anderen Experimenten zu schließen war, ist der Kurvenverlauf im Sättigungsbereich der hier gezeigten Kurve unspezifisch, d.h. es handelt sich um Schwankungen um einen Mittelwert. Aus dem Mittelwert der Meßwerte für 10 - 60 min errechnet sich eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 16,0 fmol/mg Protein bzw. 2,7 fmol/mg Gewebe, die gut mit den aus der konzentrationsabhängigen Bindungskurve für die hochaffine Bindungsstelle errechneten Werten übereinstimmt (siehe Tabelle 2).

Zwei vergleichende Experimente im Konzentrationsbereich der niederaffinen Bindung (84 bzw. 103 nM) zeigten einen grundsätzlich ähnlichen Bindungsverlauf bezüglich der halb-

maximalen Bindung und des "overshoots". Die Streuung der Meßwerte im Gleichgewicht war jedoch, wie schon in den anderen Experimenten in diesem Konzentrationsbereich, sehr groß.

3.1.5 Diskussion

Die Ergebnisse der Bindungsexperimente sollen an dieser Stelle zusammengefaßt, mit bereits vorliegenden Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen und interpretiert werden.

Cholinerge Bindung von [^{3}H]Acetylcholin, Anteil der nicotinischen und der muscarinischen Bindung:

Für die gesamte cholinerge Bindung in Rattenhirnhomogenat wurde eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 221 fmol/mg Protein bzw. 34 fmol/mg Gewebe bestimmt.

Der Mittelwert von B_{max} aus verschiedenen Experimenten für die hochaffine Bindungsstelle beträgt 19,4 $\pm$ 4,5 fmol/mg Protein bzw. 3,3 $\pm$ 0,7 fmol/mg Gewebe, für die niederaffine Bindungsstelle wurden 6 - 10 fmol/mg Gewebe geschätzt.

Das Verhältnis von nicotinisch-cholinerger zu muscarinisch-cholinerger Bindung beträgt demnach bezüglich der hochaffinen Bindung ca. 1:10, unter Einschluß der geschätzten niederaffinen Bindung ca. 1:3,5 bis 1:5,5.

Die in der Literatur für vergleichbare experimentelle Bedingungen angegebenen Werte unterscheiden sich erheblich (11,26,49,50). Sie reichen von einem Verhältnis nicotinischer zu muscarinischer Acetylcholinrezeptoren von 1:1 in einer älteren Arbeit (11) bis 1:22 (26). Zu dieser Frage kann demnach nur gesagt werden, daß die muscarinisch-cholinerge Bindung in Säugetierhomogenaten anscheinend deutlich höher ist als die nicotinisch-cholinerge Bindung.

Die hochaffine nicotinisch-cholinerge Bindung:

Für die hochaffine Bindung ergeben sich aus den in Tabelle 2 zusammengestellten Werten Mittelwerte für die maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 19,4 $\pm$ 4,5 fmol/mg Protein bzw. 3,3 $\pm$ 0,7 fmol/mg Gewebe und für die Dissoziationskonstante (K_D) von 36,0 $\pm$ 8,4 nM. Die Abweichungen von Experiment zu Experiment sind mit einer Standardabweichung von 23% bzw. 22% des Mittelwertes für die Versuchsbedingungen in Hirnhomogenaten relativ gering. Romano und Goldstein (25) geben für ihre Experimente Meßbereiche für B_{max} von 2,7 bis 6,1 fmol/mg Gewebe und für die K_D von 20 bis 89 nM an.

Ein Vergleich der gefundenen Werte mit den bereits von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Werten für B_{max} und K_D zeigt eine recht gute Übereinstimmung (siehe Tabelle 1). Besonders gut ist die Übereinstimmung mit Romano und Goldstein (25), die ihre Werte ebenfalls ausdrücklich auf die hochaffine Bindungsstelle beziehen.

In der zeitabhängigen Bindung wird die halbmaximale Bindung bei ca. 2 min erreicht, und es zeigt sich ein "overshoot" bei ca. 4 min. Schwartz et al. (26) geben für die halbmaximale Bindung 3,2 min bei 0° C an.

Die niederaffine nicotinisch-cholinerge Bindung:

Es konnte gezeigt werden, daß auch die niederaffine Bindung cholinerg ist, was von Schwartz et al. (26) bezweifelt worden war, da sie bis dahin nur mit [^{3}H]Nicotin identifiziert worden war (25).

Es konnte auch gezeigt werden, daß es sich nicht um einen unspezifischen, temperaturabhängigen Membraneffekt handelt, wie von Marks und Collins (27) vorgeschlagen wurde, da die niederaffine Bindung auch bei einer höheren Inkubationstemperatur zu sehen war.

Wie aus dem Ergebnis der zeitabhängigen Bindung geschlos-

sen werden kann, steht anscheinend auch die niederaffine Bindungsstelle sofort zur Bindung zur Verfügung, Kompartimentierungs- oder Diffusionsvorgänge scheinen also am Auftreten der niederaffinen Bindung bei höheren Ligandenkonzentrationen nicht beteiligt zu sein.

Die genaue quantitative Bestimmung der niederaffinen Bindung mit der hier verwendeten Filtrationsmethode ist wegen der bereits erwähnten Beziehung zwischen Affinität, Filtrationszeit und Höhe des Verlustes durch Abdissoziation (siehe 3.1.1) nicht möglich, dürfte doch die Filtrationszeit nach den angegebenen Richtwerten bei einer K_D von 10^{-7} M nur noch 0,1 s betragen, um nicht mehr als 10% an spezifischer Bindung zu verlieren. Die für die spezifische Bindung im niederaffinen Konzentrationsbereich gemessenen Werte dürften also in der Regel zu niedrig sein.

Aus fünf Experimenten wurde aus dem Anstieg der Bindungskurve bei höheren [^{3}H]Acetylcholinkonzentrationen auf eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von ca. 6 - 10 fmol/mg Gewebe und eine Dissoziationskonstante (K_D) im Bereich von 10^{-7} - 10^{-6} M geschlossen. Romano und Goldstein (25) geben für die mit [^{3}H]Nicotin identifizierte niederaffine Bindung eine maximale Bindungskapazität von 10,4 fmol/mg Gewebe und eine Dissoziationskonstante von 460 nM als Ergebnis eines Experimentes an und erwähnen erhebliche Abweichungen von Experiment zu Experiment, ohne diese Angabe zu konkretisieren.

Zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppen, die keine niederaffine Bindung identifizieren konnten, ist folgendes zu bemerken:

Schwartz et al. (25) haben die [^{3}H]Acetylcholin-Bindung gemäß ihrer veröffentlichten Bindungskurve nur bei Konzentrationen bis 40 nM gemessen. In diesem Bereich ist jedoch noch keine niederaffine Bindung zu erwarten. Marks und Collins (27) haben mit [^{3}H]Nicotin zwar in einem Konzentrationsbereich bis 200 nM gemessen, die 6 Meßpunkte

liegen aber besonders im Sättigungsbereich der hochaffinen Bindung (nur 2 Meßpunkte) nicht dicht genug, so daß in der veröffentlichten Bindungskurve der zweiphasige Verlauf nicht deutlich wird. Die hohen Werte für die maximale Bindungskapazität (88 fmol/mg Protein) und die Dissoziationskonstante (58,6 nM) (siehe Tabelle 1) sprechen dafür, daß darin die niederaffine Bindung mit enthalten ist.

Zur Interpretation der hoch- und niederaffinen Bindung:

Für die Bedeutung der hoch- und niederaffinen Bindung gibt es viele Möglichkeiten.

Es könnten sich darin zwei verschiedene Zustände des Rezeptors mit unterschiedlicher Affinität für Agonisten ausdrücken, die man z.B. bei der sogenannten "Desensitivierung" beim peripheren nicotinischen Acetylcholinrezeptor beobachtet (vergleiche 3.1.1).

Es könnte sich aber auch um zwei Bindungsstellen am selben Rezeptormolekül mit unterschiedlicher Affinität für Agonisten handeln. Auch zwei verschiedene nicotinisch-cholinerge Rezeptorpopulationen kommen in Betracht, z.B. im Sinne von prä- oder postsynaptischen Rezeptoren, sogenannten "Reserve"-Rezeptoren usw.

Aus der niedrigen Affinität der zweiten Bindungsstelle kann jedenfalls nicht ohne weiteres auf deren physiologische Bedeutungslosigkeit geschlossen werden, hat doch Acetylcholin z.B. an der neuromuskulären Endplatte auch eine relativ niedrige Affinität (K_D ca. 10^{-6} M).

Die Frage nach der Bedeutung der hoch- und niederaffinen Bindung bedarf weiterer Aufklärung, möglichst unter verbesserten experimentellen Bedingungen (vergleiche 1.2).

3.2 Einige pharmakologische Eigenschaften des zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptors

2.2.1 d-Tubocurarin

In neurophysiologischen Experimenten an cholinergen Synapsen des Zentralen Nervensystems hat der periphere nicotinisch-cholinerge Antagonist d-Tubocurarin erregende und hemmende Wirkungen (13). Am zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor hat d-Tubocurarin von allen untersuchten cholinergen Antagonisten die besten kompetitiven Eigenschaften im Konzentrationsbereich hochaffiner Bindung (25, 26,27). Bei einer Konzentration von 1mM verdrängt d-Tubocurarin [^{3}H]Acetylcholin vollständig aus der hochaffinen Bindungsstelle (26). Abbildung 6 a) zeigt einen Bindungstest für [^{3}H]Acetylcholin im Konzentrationsbereich hoch- und niederaffiner Bindung. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 1 mM d-Tubocurarin gemessen.

Es zeigt sich ein ebenfalls zweiphasiger Verlauf der Bindungskurve, d.h. d-Tubocurarin verdrängt [^{3}H]Acetylcholin sowohl aus der hochaffinen, als auch aus der niederaffinen Bindung. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Nordberg und Larsson (48) für [^{3}H]d-Tubocurarin eine hoch- und eine niederaffine Bindung im Mäusehirn beschrieben haben.

Die hochaffine Bindung (Konzentration bis 60 nM) wurde in der "Doppelt-reziproken Auftragung" analysiert (siehe Methoden 5.6) (Abbildung 6 b)). Es ergibt sich eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 22,0 fmol/mg Protein bzw. 3,6 fmol/mg Gewebe und eine Dissoziationskonstante (K_D) von 35,7 nM. Ein Vergleich mit den Werten aus den Experimenten, bei denen die unspezifische Bindung mit Carbamylcholin bestimmt wurde, ergibt eine recht gute Übereinstimmung (siehe Tabelle 2).

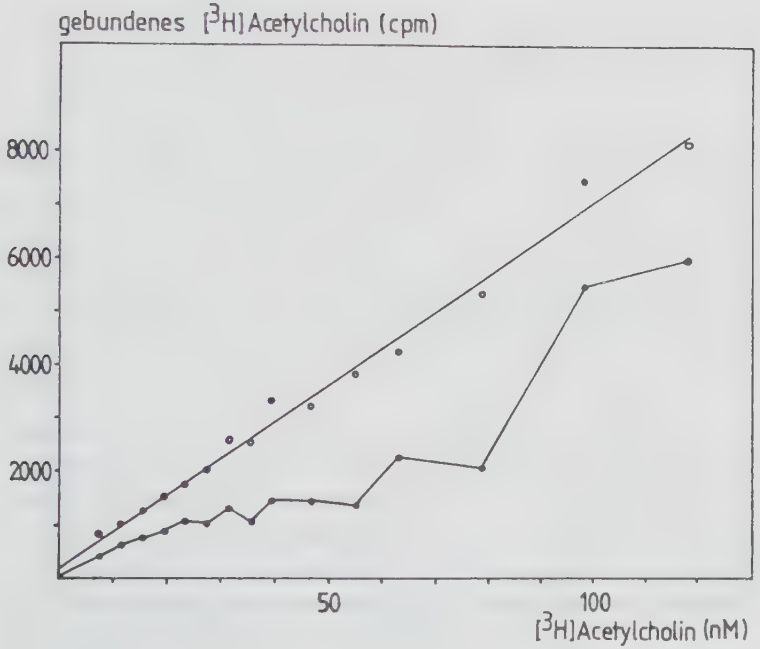

Abb. 6 a): Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an nicotinisch-cholinerge Rezeptoren in Rattenhirnhomogenat. (-●-) Spezifische Bindung, (-o-) unspezifische Bindung bei 1 mM d-Tubocurarin (lineare Regression).

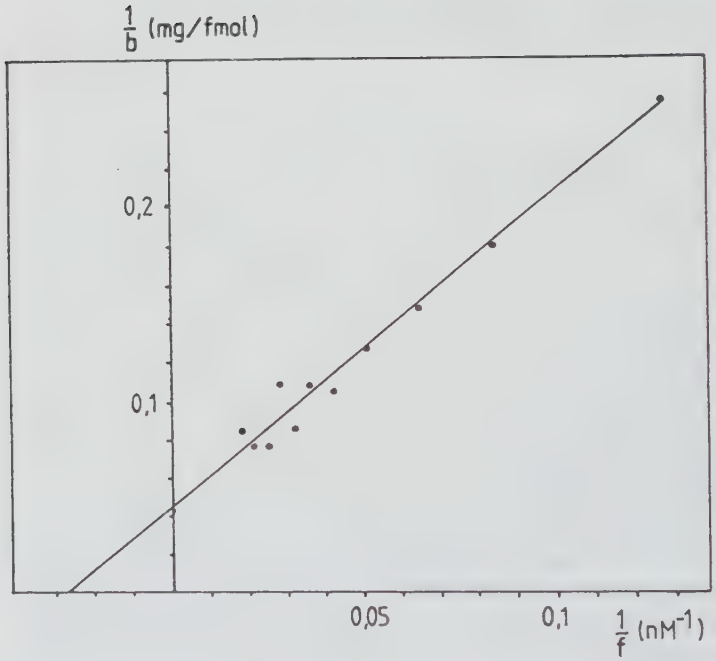

Abb. 6 b): "Doppelt-reziproke Auftragung" für die hochaffine Bindung. b = gebundenes [^{3}H]Acetylcholin (fmol/mg Protein), f = freies [^{3}H]Acetylcholin (nM).

3.2.2 α-Bungarotoxin

Zur Klärung der Frage, ob α-Bungarotoxin [^{3}H]Acetylcholin aus der nicotinisch-cholinergen Bindung im Zentralen Nervensystem verdrängen kann, wurde die Bindung von [^{3}H]Acetylcholin in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 µM α-Bungarotoxin gemessen und zwar im Konzentrationsbereich der hochaffinen (38 nM [^{3}H]Acetylcholin) und der niederaffinen (90 nM [^{3}H]Acetylcholin) Bindung. Der Vergleich ergab in beiden Konzentrationsbereichen keine Abnahme der Bindung in Gegenwart von 10 µM α-Bungarotoxin, obwohl die Dissoziationskonstante für die α-Bungarotoxin-Bindungsstelle im Zentralen Nervensystem kleiner als 10^{-9} M sein soll (27).

Demnach bindet α-Bungarotoxin zumindest nicht an die Agonistenbindungsstelle des nicotinischen Acetylcholinrezeptors im Zentralen Nervensystem. Das schließt natürlich nicht aus, daß α-Bungarotoxin an eine hypothetische weitere Bindungsstelle des nicotinischen Acetylcholinrezeptors im Zentralen Nervensystem binden könnte. Insofern müßte sich dann der zentrale vom peripheren nicotinischen Acetylcholinrezeptor unterscheiden.

Da diese Frage ungeklärt ist, sollte die α-Bungarotoxin-Bindungsstelle nicht mit dem zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor gleichgesetzt werden, zumal auch andere Argumente gegen diese Hypothese sprechen, wie bereits diskutiert wurde (siehe 1.2).

3.2.3 Arecolin

Arecolin ist ein Inhaltsstoff der Betelnuß (Frucht von Areca catechu L.) und wurde in neurophysiologischen Experimenten vielfach als cholinerger Agonist verwendet. Die physiologische Wirkung wird als muscarinisch angesehen (6), es wird aber auch eine nicotinartige Wirkung diskutiert (8).

Abbildung 7 zeigt die Verdrängung von [^{3}H]Acetylcholin im Konzentrationsbereich hochaffiner Bindung durch Arecolin.

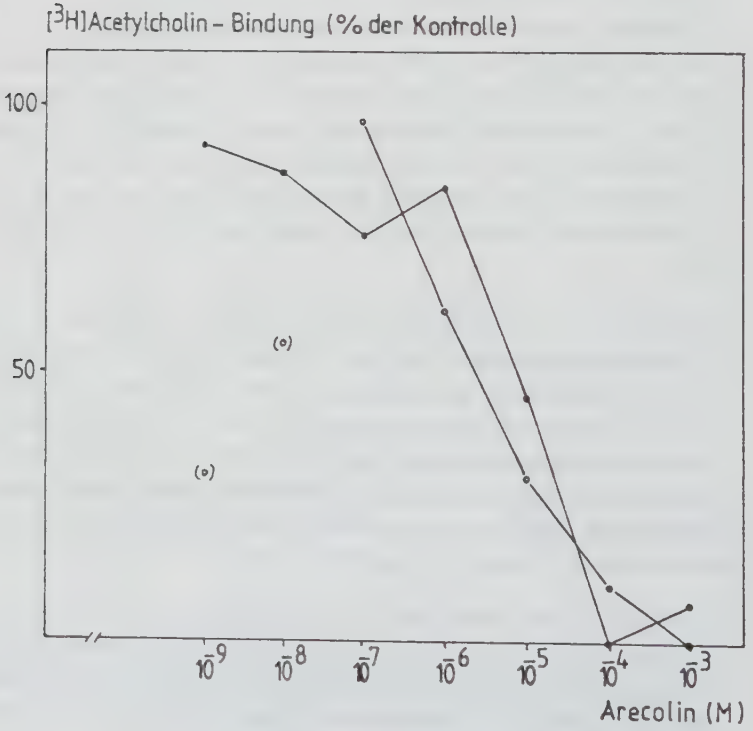

Abb. 7: Verdrängung von [^{3}H]Acetylcholin (22 nM) in Rattenhirnhomogenat durch variable Arecolinkonzentrationen am (-•-) nicotinischen und am (-o-) muscarinischen Acetylcholinrezeptor. Kontrolle ohne Arecolin. Unspezifische Bindung mit 100 µM Carbamylcholin.

Die Bestimmung der Verdrängung am nicotinischen Acetylcholinrezeptor erfolgte in Gegenwart von 1,5 µM Atropin, für die Verdrängung am muscarinischen Rezeptor wurde die Differenz gebildet zwischen der Verdrängung in Abwesenheit und in Gegenwart von 1,5 µM Atropin.

Die errechneten Inhibitionskonstanten (siehe Methoden 5.7) unterscheiden sich mit $K_i = 4{,}6 \times 10^{-6}$ M für den nicotinisch-cholinergen Rezeptor und $K_i = 2{,}9 \times 10^{-6}$ M für den muscarinisch-cholinergen Rezeptor nur wenig.

Arecolin bindet also mit etwa gleicher Affinität an den nicotinischen und den muscarinischen Acetylcholinrezeptor und hat damit ähnliche Eigenschaften wie der cholinerge Agonist Carbamylcholin (27).

3.3 Substanz P als Neuromodulator am zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor? Ein Modellversuch

3.3.1 Einige Überlegungen und Anmerkungen zu den experimentellen Methoden

Bei Experimenten mit Neuropeptiden ergibt sich das Problem, daß diese durch eine Vielzahl unspezifischer endogener Peptidasen im Hirnhomogenat sehr schnell abgebaut werden (51,52). Es galt deshalb, eine begrenzte Zahl von geeigneten Inhibitoren zu finden, die möglichst viele der vorhandenen Peptidasen möglichst effektiv hemmen sollten, um den Abbau von Substanz P im Experiment zu verhindern. Mit Hilfe der Arbeitsgruppe Bauer (53) gelang es, drei inhibitorische Substanzen in das Experiment einzuführen (siehe Methoden 5.8) und zu zeigen, daß unter diesen Bedingungen Substanz P nicht abgebaut wird (Abbildung 8).

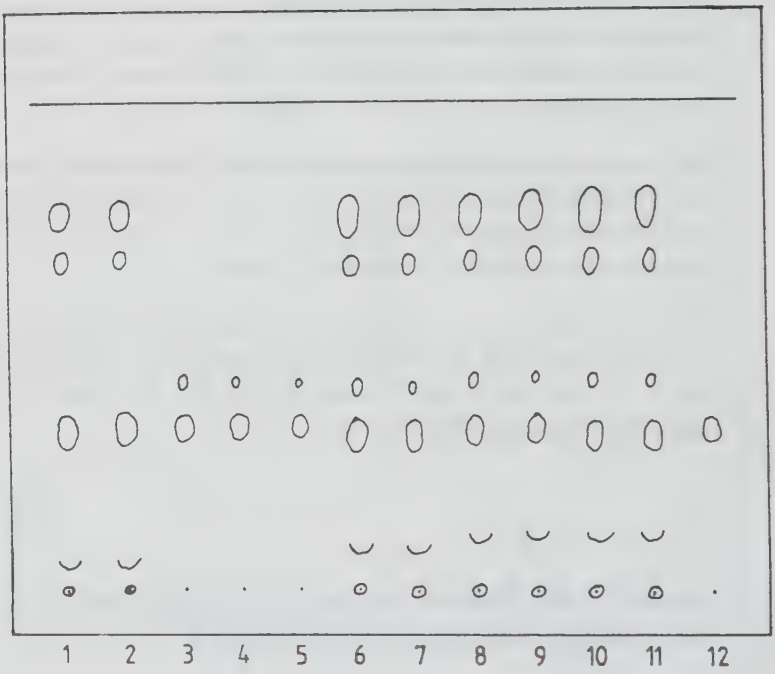

Abb. 8: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Substanz P (◄). Versuchsansatz wie beim Bindungstest mit 30 nM unmarkiertem Acetylcholin und ohne bzw. mit 100 µM Substanz P.

Spur 1,2 : Versuchsansatz ohne Substanz P

Spur 3,4,5: Substanz P in Tris-Puffer (variable Mengen)

Spur 6,7 : Versuchsansatz mit Substanz P (2,0 µg) bei 60 min Inkubation

Spur 8,9 : Versuchsansatz mit Substanz P (1,4 µg) bei 60 min Inkubation

Spur 10,11: Versuchsansatz mit Substanz P (2,0 µg, 1,4 µg) ohne Inkubation

Spur 12 : Tris-Puffer

R_f-Werte für Substanz P: 0,41 - 0,43

3.3.2 Konzentrationsabhängige Bindung von [^{3}H]Acetylcholin in Anwesenheit von Substanz P

Es wurde die spezifische Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an den nicotinischen Acetylcholinrezeptor im Konzentrationsbereich der hochaffinen Bindung (bis 60 nM [^{3}H]Acetylcholin) in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 µM Substanz P verglichen. Der Bindungstest erfolgte in Gegenwart von drei Peptidase-Inhibitoren wie unter Methoden 5.8 beschrieben. In drei Experimenten war kein signifikanter Unterschied der konzentrationsabhängigen Bindung in diesem Bereich zu erkennen. Die spezifische Bindung war quantitativ in allen Versuchen geringer, d.h. der Kurvenverlauf flacher, und die Meßwerte streuten mehr als sonst in diesem Konzentrationsbereich. Als mögliche Ursachen kommen die durch die Inhibitoren experimentell notwendige Verschiebung des pH-Wertes von 7,4 auf 7,7 (siehe Methoden 5.8) oder eine Interferenz der Inhibitoren selbst mit der Bindung in Betracht. Von Lee et al. (54) wurde kürzlich ebenfalls eine nichtkompetitive Verminderung der spezifischen Bindung von Substanz P durch Peptidase-Inhibitoren (N-Ethylmaleimid, p-Chlor-mercuriphenylsulfonat) beschrieben.

3.3.3 Zeitabhängige Bindung von [^{3}H]Acetylcholin in Anwesenheit von Substanz P

Es wurde die zeitabhängige Bindung von [^{3}H]Acetylcholin an den nicotinischen Acetylcholinrezeptor im Konzentrationsbereich der hochaffinen Bindung (49 nM) in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 µM Substanz P verglichen. Die Zeitabstände entsprachen denen in Abbildung 5. Es war kein eindeutiger Unterschied im Kurvenverlauf festzustellen, die Zeit für die halbmaximale Bindung betrug wiederum ca. 2 min, auch der "overshoot" war in zwei Versuchen bei ca. 3 min zu sehen.

3.3.4 Diskussion

Ein neuromodulatorischer Einfluß von Substanz P auf die Acetylcholin-Bindung am zentralen nicotinischen Acetylcholinrezeptor durch Änderung der Affinität oder der Kinetik konnte im Konzentrationsbereich der hochaffinen Bindung nicht nachgewiesen werden.

Ausgeschlossen ist damit jedoch nicht eine solche Wirkung an Subpopulationen nicotinisch-cholinerger Synapsen entsprechend einer Hypothese von Hökfelt (33,34), die bereits erwähnt wurde (vergleiche 1.3). Mit den zur Verfügung stehenden experimentellen Methoden könnte eine solche partielle Wirkung auch kaum identifiziert werden.

Aus methodologischen Gründen wurde dieses Experiment auch nicht im Bereich niederaffiner Bindung durchgeführt.

Dennoch kann der vorgestellte Versuchsansatz als exemplarisch gelten für die Untersuchung einer solchen neuromodulatorischen Funktion von Neuropeptiden an zentralen Neurotransmitterrezeptoren.

4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Für [^{3}H]Acetylcholin ließ sich in Anwesenheit von Atropin in Rattenhirnhomogenat eine hoch- und eine niederaffine Bindung nachweisen.

Die hochaffine Bindung konnte mit B_{max} = 19,4 $\pm$ 4,5 fmol/mg Protein bzw. 3,3 $\pm$ 0,7 fmol/mg Gewebe und K_D = 36,0 $\pm$ 8,4 nM charakterisiert werden.

Für die niederaffine Bindung beträgt B_{max} ca. 6 - 10 fmol /mg Gewebe und die K_D liegt im Bereich von 10^{-7} - 10^{-6} M. Das Auftreten der niederaffinen Bindung bei 4° C Inkubationstemperatur ab einer eingesetzten [^{3}H]Acetylcholinkonzentration von ca. 50 nM wird bei einer Inkubationstemperatur von 22° C zu höheren Konzentrationen verschoben (ca. 90 nM [^{3}H]Acetylcholin).

Ein Vergleich mit der muscarinisch-cholinergen Bindung im Rattenhirn ergibt eine Verhältnis von ca. 1:10 für die hochaffine Bindungsstelle und 1:3,5 bis 1:5,5 unter Einschluß der niederaffinen Bindungsstelle.

Der nicotinisch-cholinerge Antagonist d-Tubocurarin hemmt bei einer Konzentration von 1 mM sowohl die hochaffine als auch die niederaffine Bindung von [^{3}H]Acetylcholin in Anwesenheit von Atropin.

Der im Gehirn mit hoher Affinität (K_D kleiner als 10^{-9} M) bindende Antagonist α-Bungarotoxin zeigt bei einer Konzentration von 10 µM weder an der hochaffinen noch an der niederaffinen Bindungsstelle kompetitive Eigenschaften.

Der cholinerge Agonist Arecolin bindet mit etwa gleicher Affinität an die hochaffine nicotinisch-cholinerge Bindungsstelle und den muscarinisch-cholinergen Rezeptor und hat insofern ähnliche Eigenschaften wie Carbamylcholin.

In einem Modellversuch konnte ein neuromodulatorischer Einfluß von Substanz P auf die hochaffine Bindung von [^{3}H]Acetylcholin im Sinne einer Änderung der Affinität und Bindungskinetik nicht nachgewiesen werden.

5 METHODEN

5.1 Präparation des Rattenhirnhomogenates

Weibliche Fischer-Ratten wurden dekapitiert, das Gehirn einschließlich Medulla oblongata wurde entnommen. Das Kleinhirn wurde verworfen, da es relativ wenig nicotinische Acetylcholinrezeptoren enthält (26 - 28), die weichen Hirnhäute wurden soweit als möglich entfernt. Die so präparierten Gehirne wogen zwischen 1,3 und 1,7 g. Das Homogenisieren erfolgte in einem Teflon-Homogenisator (Typ 853202, Braun, Melsungen) in 20 ml Tris-HCl-Puffer (s.u.) pro g Gewebe und 100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) als Proteasehemmer. Das Rohhomogenat wurde 10 min mit 47800 g bei 4° C zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wiederum in 20 ml Tris-HCl-Puffer und 100 µM PMSF mit einer Spritze homogenisiert und nochmals für 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 20 ml Tris-HCl-Puffer pro g Gewebe unter Zusatz von 100 µM PMSF homogenisiert, so daß 1 ml Homogenat 50 mg Gewebe entsprachen.

Tris-HCl-Puffer nach Schwartz et al. (26) mit

50 mM Tris-HCl
1 mM $MgCl_2$
120 mM NaCl
5 mM KCl
2 mM $CaCl_2$
1 µM Atropinsulfat (Merck, Darmstadt)

und zusätzlich 0,2 g/l NaN_3

pH 7,4 bei 4° C

5.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Folin-Methode nach Lowry (55).

Lösung A: 1 g NaOH
20 g Na_2CO_3
0,2 g KNa-Tartrat in 1 l H_2O
Lösung B: 0,5 g $CuSO_4$ x 5 H_2O in 100 ml H_2O
Lösung C: 50 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B
Lösung D: Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz, 1:2 verdünnt

Für die Standardkurve wurde Rinder-Serumalbumin in verschiedenen Verdünnungen in einem Volumen von je 100 µl angesetzt und je 1 ml der Lösung C zugegeben. In gleicher Weise wurden die zu bestimmenden Proben angesetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden je Ansatz 100 µl Lösung D zugegeben und nochmals 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im Photometer (PMQ 3, Zeiss) bei einer Wellenlänge von 750 nm.

Die so bestimmten Proteinkonzentrationen des Rattenhirnhomogenates betrugen meistens um 3,6 g/l (Bereich 2,7 - 4,8 g/l).

5.3 Synthese von [^{3}H]Acetylcholin

Die Synthese von [^{3}H]Acetylcholin erfolgte nach der Methode von Schwartz et al. (26) durch Veresterung von [^{3}H-methyl]Cholinchlorid mit einer spezifischen Radioaktivität zwischen 2,5 und 3,0 TBq/mmol.

Für jede Synthese wurden 9,3 MBq in 250 µl Ethanol mit N_2 in einem Reagenzglas bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden 25 µl Ethylacetat, 2,5 µl Essigsäureanhydrid und 2,5 µl Triethylamin hinzugefügt und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter mäßigem Schütteln inkubiert. Dann wurden 250 µl Ethanol hinzugefügt, geschüttelt und mit N_2 getrocknet. Für die Stammlösung wurden wieder 250 µl Ethanol

hinzugefügt und unter N_2 bei 4° C aufbewahrt.

Die Reinheit der [^{3}H]Acetylcholin-Stammlösung wurde vor jedem Experiment überprüft (siehe Methoden 5.4). Bei einer Reinheit unter 90% wurde eine Wiederveresterung vorgenommen. Nach mehr als dreimaliger Wiederveresterung war aber ein nicht korrigierbarer Abfall des Syntheseergebnisses zu beobachten, wahrscheinlich eine Folge von Radiolyse.

Später wurden Verdünnungen der Stammlösung in Tris-HCl-Puffer bei -20° C aufbewahrt, dabei lag der Verlust an bindungsfähigem [^{3}H]Acetylcholin bei ca. 3% in 14 Tagen.

[^{3}H-methyl]Cholinchlorid (Amersham Buchler, Braunschweig)
Ethylacetat (Merck, Darmstadt)
Essingsäureanhydrid (Merck, Darmstadt)
Ethanol 95% (Merck, Darmstadt)
Triethylamin (Merck, Darmstadt)
Tris-HCl-Puffer (siehe 5.1)

5.4 Zentrifugationstest zur quantitativen Bestimmung des bindungsfähigen [^{3}H]Acetylcholins

Die Präparation Acetylcholin-reicher Membranvesikel aus Elektroplaques von "Torpedo californica" bzw. "Torpedo marmorata" erfolgte routinemäßig in unserem Labor nach der an anderer Stelle veröffentlichten Methode (44,56). In Ringer-Lösung verdünnte Membranvesikel (Proteinkonzentration ca. 300 - 400 mg/l) wurden zunächst 1/2 h mit 10^{-4} M Eserin zur Hemmung der Acetylcholinesterase bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 6 Verdünnungen mit Ringerlösung (Proteinkonzentrationen zwischen 20 und 300 mg/l) in 6 Zentrifugenröhrchen angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von synthetisiertem [^{3}H]Acetylcholin (25 - 40 nM) gestartet. Der Gesamtansatz betrug 200 µl. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurden je 50 µl für die Bestimmung der Gesamtradioaktivität abgenommen und die Ansätze 15 min bei 135000 g zentrifugiert (Airfuge).

Danach wurden zur Bestimmung der ungebundenen Radioaktivität wieder je 50µl abgenommen. Die Radioaktivität der abgenommenen Aliquots wurde in je 5 ml Supertron im Szintillationszähler in Impulse/min bzw. counts per minute (cpm) gemessen.

Der Anteil der bei den hohen Proteinkonzentrationen ungebunden bleibenden Radioaktivität wurde in Prozent der Gesamtaktivität angegeben und betrug bei Neusynthesen ca. 4 - 6% (siehe auch Abb. 2). Die aus der spezifischen Radioaktivität errechneten Konzentrationen wurden entsprechend korrigiert und in den Experimenten als [^{3}H]Acetylcholinkonzentrationen angegeben.

Der Überschuß an Rezeptorbindungsstellen verglichen mit der [^{3}H]Acetylcholinkonzentration sollte groß genug sein, um die Sättigung der Bindung in mindestens 4 Meßwerten sicher zu zeigen. Dies war in der Regel bei 10- bis 100-fachem Überschuß der Fall. Die Rezeptorkonzentration errechnet sich aus dem Erfahrungswert von 80% Rezeptorprotein, einem Molekulargewicht von 270000 und der Tatsache, daß pro Rezeptormolekül zwei Bindungsstellen besetzt werden können. Eine Proteinkonzentration von 100 mg/l entspricht dann einer Konzentration von 592 M Rezeptorbindungsstellen für Acetylcholin in Membranvesikelpräparationen.

Bei der unter diesen Bedingungen dennoch frei bleibenden Radioaktivität dürfte es sich um einen Rest unverestert bleibenden [^{3}H-methyl]Cholins bzw. verschiedene Spaltprodukte handeln. [^{3}H-methyl]Cholin bindet unter diesen Bedingungen anscheinend nicht an das Rezeptorprotein, da sich eine nach längerer Lagerung im Bindungstest zeigende Erhöhung des Anteils freier Radioaktivität durch Wiederveresterung wieder auf 4 - 6% vermindern läßt.

Im übrigen sei auf die chemischen Reinheitskontrollen dieser Synthesemethode von Schwartz et al. (26) verwiesen.

Eserin (Physostigmin) (Sigma, München)
Ringer-Lösung (160 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 0,2 g/l NaN_3, pH 7,1)
Airfuge (Beckman, München)
Centrifuge tubes (Beckman,München)
Supertron (Kontron, München)
Flüssigkeitsszintillationszähler MR 300 (Kontron, München)

5.5 Filtrationstest

Der Bindungstest folgt in modifizierter Form der Methode von Schwartz et al. (26).

Rattenhirnhomogenat wurde mit 10^{-3} M Eserin zur Hemmung der Acetylcholinesterase 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Gesamtbindung wurden 250 µl Rattenhirnhomogenat (entspricht 12,5 mg Gewebe) mit Tris-HCl-Puffer und variablen [^{3}H]Acetylcholinkonzentrationen (Gesamtansatz jeweils 600 µl) 60 min bei 4° C inkubiert. Die Filtration erfolgte unter Verwendung von Glasfiberfiltern, die zuvor in 0,5 g/l Polyethylenimin (PEI) - Lösung eingeweicht worden waren, um eine spezifische Filterbindung von [^{3}H]Acetylcholin zu verhindern (26). Es wurden jeweils 500 µl (entspricht 10,4 mg Gewebe) des Ansatzes in 3 ml eiskalten Tris-HCl-Puffer verdünnt und sofort im Wasserstrahlpumpenvakuum filtriert, danach wurde noch zweimal mit jeweils 3 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer nachgewaschen. Für die Filtration wurden 15 - 20 s benötigt. Die Filter wurden in 5 ml Supertron gebracht und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die Zählausbeute betrug zwischen 38 und 42%.

Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung, die sich durch einen kompetitiven Liganden nicht verdrängen läßt und durch Linearität charakterisiert ist (vergleiche 3.1.1), wurde der Bindungstest in gleicher Weise in Gegen-

wert von 100 µM Carbamylcholin durchgeführt. Carbamylcholin hat ähnliche Eigenschaften wie Acetylcholin, wird aber nicht hydrolysiert. Aus den Meßwerten wurde mittels linearer Regression eine Gerade errechnet. Die Differenz aus Gesamtbindung und dieser Geraden ergab die spezifische Bindung.

Für die Totalwerte der eingesetzten Radioaktivität wurden jeweils 50 µl pro Ansatz in gleicher Weise gemessen.

Gesamtbindung und unspezifische Bindung wurden um die ebenfalls gemessene unspezifische Filterbindung (Filterleerwert) korrigiert.

α-Bungarotoxin (Sigma, München)
d-Tubocurarin Chlorid, Pentahydrat (Sigma, München)
Hemicholinium-3 rein, 95% (Serva, Heidelberg)
Carbamylcholinhydrochlorid (Merck, Darmstadt)
Eserin (Sigma, München)
Tris-HCl-Puffer (siehe 5.1)
Polyethylenamin (PEI) (Serva, München)
Glasfiberfilter (Whatman GF C glass microfibre filters)
Suprotron (Kontron, München)
Flüssigkeitsszintillationszähler MR 300 (Kontron, München)

5.6 Bestimmung der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) und der Dissoziationskonstanten (K_D)

Als Bindungscharakteristika werden allgemein die maximale Bindungskapazität (B_{max}) und die Dissoziationskonstante (K_D) angegeben.

Die maximale Bindungskapazität drückt die Konzentration einer sättigbaren Ligandenbindungsstelle im untersuchten Gewebe aus. Handelt es sich um einen Rezeptor mit nur einer Bindungsstelle, so gibt B_{max} die Konzentration des Rezeptormoleküls an. Die Werte von B_{max} werden in mol/g Gewebe (Naßgewicht) oder mol/mg Protein angegeben. Der

Anteil der Bindungsstellen kann sich sowohl im Verhältnis zum Gesamtgewebe als auch zum Gesamtprotein von Tier zu Tier ändern, im allgemeinen werden aber ähnliche Werte innerhalb einer Spezies gemessen.

Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Affinität des Liganden L zum Rezeptor R im Gleichgewicht:

$$K_D = \frac{[R] \times [L]}{[RL]}$$

Aus der Gleichung ergibt sich, daß K_D umso kleiner ist, je größer $[RL]$, d.h. die Affinität ist.

Der Verlauf einer Sättigungskurve ist hyperbolisch, sofern nur eine Bindungsstelle an der Ligandenbindung beteiligt ist bzw. mehrere Bindungsstellen, die sich in ihren Bindungseigenschaften für den untersuchten Liganden im Gleichgewicht nicht unterscheiden. In einem mehrphasigem Kurvenverlauf drückt sich die Beteiligung mehrerer Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität am gleichen oder an verschiedenen Molekülen aus bzw. eine Zustandsänderung derselben Bindungsstelle.

Die genannten Charakteristika lassen sich graphisch auf verschiedene Weise analysieren (45,46), hier wurden die "Auftragung nach Scatchard" (Scatchard plot) und die "Doppelt-reziproke Auftragung" (double reciprocal plot) verwendet.

Für die "Auftragung nach Scatchard" wird entsprechend der Scatchard-Gleichung (Herleitung siehe 45,46)

$$\frac{b}{f} = -\frac{1}{K_D} \times b + \frac{B_{max}}{K_D}$$

auf der Abszisse b (gebundener Ligand) und auf der Ordinate der Quotient aus gebundenem und freiem Liganden ($\frac{b}{f}$) aufgetragen. Die Steigung der Geraden ergibt den negativen reziproken Wert von K_D, der Durchgang durch die x-Achse ergibt B_{max}. Eine Gerade ergibt sich jedoch nur, wenn nur eine Bindungsstelle mit nichtkooperativer Bin-

dung vorliegt. Bei positiver Kooperativität ergibt sich eine konvexe Kurve, bei negativer Kooperativität oder mehreren Bindungsstellen verläuft die Kurve konkav. Bei der "Auftragung nach Scatchard" sollten im Gleichgewicht weniger als 10% des eingesetzten Liganden an das Gewebe gebunden sein (45), unter dieser Bedingung kann die freie Ligandenkonzentration f der im Experiment eingesetzten Ligandenkonzentration gleichgesetzt werden. Diese Bedingung trifft in den vorliegenden Bindungsexperimenten zu (ca. 0,1%).

Bei der "Doppelt-reziproken Auftragung" wird der reziproke Wert des gebundenen Liganden gegen den reziproken Wert der freien Ligandenkonzentration nach der Gleichung (Herleitung siehe 45)

$$\frac{1}{b} = \frac{K_D}{B_{max}} \times \frac{1}{f} + \frac{1}{B_{max}}$$

aufgetragen. Aus dem Durchgang durch die y-Achse ergibt sich der reziproke Wert von B_{max} und aus dem Durchgang durch die x-Achse der negativ reziproke Wert der K_D. Auch in dieser Auftragung kann der Kurvenverlauf analysiert werden (45), eignet sich aber für diesen Zweck nicht so gut wie die "Auftragung nach Scatchard". Bezüglich der freien Ligandenkonzentration gelten die gleichen Bedingungen wie für die "Auftragung nach Scatchard".

5.7 Inhibitionskonstante K_i

Die spezifische Rezeptorbindung eines radioaktiv markierten Liganden kann durch variable Konzentrationen desselben unmarkierten Liganden oder eines anderen kompetitiven Liganden aus der Bindung verdrängt werden. Die Konzentration des unmarkierten Liganden bei halbmaximaler Verdrängung wird als IC_{50} bezeichnet. Für die Bestimmung der Inhibitionskonstanden K_i gilt folgende Formel (45):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}}$$

Die von verschiedenen Autoren bestimmten Werte der K_i für einen kompetitiven Liganden können zumindest der Größenordnung nach miteinander verglichen werden, wenn die Konzentration [L] und die K_D des verdrängten radioaktiv markierten Liganden in der gleichen Größenordnung liegen, was häufig der Fall ist (hier nM).

5.8 Filtrationstest mit Peptidase-Inhibitoren

In den schon beschriebenen Filtrationstest (5.5) sollten für die Versuche mit Substanz P entsprechend einer persönlichen Mitteilung von Karl Bauer (53) drei Peptidase-Inhibitoren eingeführt werden:

1 mM 1,10-Phenantrolin-Monohydrat (Sigma, München)

1 mM p-Hydroxymercuribenzoesäure (PCMBS), (Serva, Heidelberg)

1 mM Diisopropylfluorphosphat (DFP), (Fluka AG, Buchs, Schweiz)

Es wurde eine 10 mM Stammlösung hergestellt, die im Ansatz 1:10 verdünnt wurde.

Phenantrolin wurde zunächst in 50 µl Methanol gelöst, danach unter intensivem Schütteln in 1:100 Tris-HCl-Puffer (siehe 5.1) hineinverdünnt.

PCMBS wurde in Tris-Puffer gegeben und vorsichtig mit 0,1 M NaOH bis zur vollständigen Auflösung titriert.

DFP wurde der Stammlösung zum Schluß beigegeben, geringe Ausfällung von PCMBS wurde nochmals mit 0,1 M NaOH titriert.

Für den Filtrationstest wurde Rattenhirnhomogenat mit 10^{-3} M Eserin und 10^{-3} M Inhibitoren-Stammlösung w.o. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im übrigen wurde

der Filtrationstest ausgeführt wie schon beschrieben (5.5).

Der pH-Wert im Versuchsansatz verschob sich durch die zur Lösung von PCMBS notwendige Titration mit NaOH von 7,4 auf 7,7.

5.9 Dünnschichtchromatographie von Substanz P

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Glasplatten verwendet (Kieselgel DC Fertigplatte 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Merck, Darmstadt).

Das Laufmittel hatte entsprechend einem Vorschlag von Karl Bauer (53) folgende Zusammensetzung:

5 Volumenteile Ethylacetat
5 Volumenteile Pyridin
1 Volumenteil Eisessig
3 Volumenteile H_2O

Aus der Arbeitsgruppe Bauer (53) sind mit diesem Laufmittel folgende R_f-Werte für Substanz P bzw. dessen Bruchstücke bekannt:

Substanz P	0,51
Aminosäuresequenz 1 - 8	0,32
Aminosäuresequenz 7 - 11	0,96
Aminosäuresequenz 8 - 11	0,87
Phenylalanin	0,74

Diese Werte können zur Analyse des Ergebnisses dienen.

Auf die Kieselgelplatten wurden aufgetragen:

Spur	Ansatz	aufgetrag. Volumen (µl)	= Substanz P (µg)
1	Versuchsansatz ohne Substanz P	15	
2	" " " "	10	
3	Substanz P in Tris-Puffer, 100 µM	15	2,03
4	" " " " " " "	10	1,35
5	" " " " " " "	5	0,68
6	Versuchsansatz mit 100 µM Substanz P unter Versuchsbedingungen	15	2,03
7	wie 6	15	2,03
8	wie 6	10	1,35
9	wie 6	10	1,35
10	Versuchsansatz mit 100 µM Substanz P direkt vor dem Auftragen	15	2,03
11	wie 10	10	1,35
12	Tris-HCl-Puffer	10	

Nach dem Auftragen wurde die Platte in die Kammer mit dem Laufmittel gestellt, Laufzeit ca. 3 1/2 Stunden, Markierung der Laufmittelfront.

Trocknen der Platte, Behandlung mit Ninhydrin-Sprühreagenz 0,1% (Merck, Darmstadt), Trocknen.

Berechnung der R_f-Werte für Substanz P (0,41 - 0,43).

6 LITERATUR

1 Changeux, J.-P. (1981)
"The acetylcholine receptor: An "allosteric" membrane protein"
Harvey Lectures 75, 85-254

2 Drachman, D.B. (1981)
"The biology of myasthenia gravis"
Ann. Rev. Neuroscience 4, 195-225

3 Hucho, F. (1981)
"The nicotinic acetylcholine receptor"
Trends Biochem. Sci. 6, 242-244

4 Prives, J.M. (1980)
"Nicotinic acetylcholine receptors"
In: "Cellular Receptors for Hormones and Neurotransmitters" (Schulster, D., Levitzki, A., Hrsg.), 331-351
John Wiley & Sons Ltd. 1980

5 Wächtler, K. (1981)
"The regional distribution of acetylcholine, cholinacetyl transferase and acetylcholinesterase in vertebrate brains of different phylogenetic levels"
In: "Cholinergic Mechanims" (Pepeu, G., Landinsky, H., Hrsg.), 59-72
Plenum Press, New York and London

6 DeFeudis, F.V. (1974)
"Central Cholinergic Systems And Behaviour"
Academic Press Inc., London

7 Michell, R.H. (1980)
"Muscarinic acetylcholine receptors"
wie Ref. 4, 353-368

8 Goodman and Gilman's
"The Pharmalogical Basis of Therapeutics"
Macmillan Co., Inc., New York, 6. Edition, 1980

9 Opitz, K., Horstmann, M. (1981)
"Nicotin"
Dtsch. Ärztebl. 40, 1869-1973

10 DeRobertis, E., Azcurra, J.M. Fiszer, S. (1967)
"Ultrastructure and cholinergic binding capacity of junctional complexes isolated from rat brain"
Brain Res. 5, 45-56, zitiert nach (1)

11 Schleifer, L.S., Eldefrawi, M.E. (1974)
"Identification of the nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in subcellular fractions of mouse brain"
Neuropharmacology 13, 53-63

12 Schmidt, J., Hunt, St., Polz-Tejera, G. (1980)
"Nicotinic receptors of the central and autonomic nervous system"
In: "Neurotransmitters, Receptors and Drug Action" (Essman, W.B., Hrsg.), 1-65
Spectrum Publications, New York, London

13 Barnard, E.A., Dolly, J.O. (1982)
"Peripheral and central nicotinic acetylcholine receptors - how similar are they?"
Trends Neurosci. 5, 325-327

14 Lukas, R.J., Bennett, E.L. (1980)
"Chemical modification and reactivity of sulfhydryls and disulfides of rat brain nicotinic-like acetylcholine receptors"
J. Biol. Chem. 255, 5573-5577

15 Lukas, R.J., Bennett, E.L. (1980)
"Interaction of nicotinic receptor affinity reagents with central nervous system α-Bungarotoxin-binding entities"
Mol. Pharmacol. 17, 149-155

16 Eterovic, V.A., Bennett, E.L. (1974)
"Nicotinic cholinergic receptor in brain detected by binding of α-[^{3}H]Bungarotoxin"
Biochim. Biophys. Acta 362, 346-355

17 Morley, B.J., Kemp, G.E. (1981)
"Characterization of a putative nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain"
Brain Res. Rev. 3, 81-104

18 Morley, B.J., Dwyer, D.S., Strang-Brown, P.F., Bradley, R.J., Kemp, G.E. (1983)
"Evidence that certain peripheral anti-acetylcholine-receptor-antibodies do not interact with brain α-Bungarotoxin binding sites"
Brain Res. 262, 109-112

19 Norman, R.I., Mehraban, F., Barnard, E.A., Dolly, J.O. (1981)
"Nicotinic acetylcholine receptor from chick optic lobe"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1321-1325

20 Freeman, J.A. (1977)
"Possible regulatory function of acetylcholine receptor in maintenance of retinotectal synapses"
Nature 269, 218-222

21 Oswald, R.E., Freeman, J.A. (1981)
"α-Bungarotoxin binding and central nervous system nicotinic acetylcholine receptor"
Neuroscience 6, 1-14

22 Morley, B.J., Farley, G.R., Javel, E. (1983)
"Nicotinic acetylcholine receptors in mammalian brain"
Trends Pharmacol. Sci. 4, 225-227

23 Abood, L.G., Reynolds, D.T., Bidlack, J.M. (1980)
"Stereospecific [^{3}H]Nicotine binding to intact and solubilized rat brain membranes and evidence for its noncholinergic nature"
Life Sci. 27, 1307-1314

24 Abood, L.G., Latham, W. Grassi, S. (1983)
"Isolation of an nicotine binding site from rat brain by affinity chromatography"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3536-3539

25 Romano, C., Goldstein, A. (1980)
"Stereospecific nicotine receptors on rat brain membranes"
Science 210, 647-649

26 Schwartz, R.D., McGee Jr., R., Kellar, K.J. (1982)
"Nicotinic cholinergic receptors labeled by [^{3}H]Acetylcholine in rat brain"
Mol. Pharmacol. 22, 56-62

27 Marks, J.M., Collins, A.C. (1982)
"Characterization of nicotine binding in mouse brain and comparison with the binding of α-bungarotoxin and quinuclidinyl benzilate"
Mol. Pharmacol. 22, 554-564

28 Yoshida, K., Imura, H. (1979)
"Nicotinic cholinergic receptors in brain synaptosomes"
Brain Res. 172, 453-459

29 Sershen, H., Reith, M.E.A., Lathja, A., Gemaro, J. (1981)
"Noncholinergic saturable binding of [^{3}H]Nicotine to mouse brain"
J. Receptor Res. 2, 1-15, zitiert nach (27)

30 Snyder, S.H. (1980)
"Brain peptides as neurotransmitters"
Science 209, 976-983

31 Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, Å, Lundberg, J.M., Schultzberg, M. (1980)
"Peptidergic neurones"
Nature 284, 515-521

32 Iversen, L.L. (1983)
"Neuropeptides - what next?"
Trends Neurosci. 6, 293-294

33 Swanson, L.W. (1983)
"Neuropeptides - new vistas on synaptic transmission"
Trends Neurosci. 6, 294-295

34 Lundberg, J.M., Hökfelt, T. (1983)
"Coexistence of peptides and classical transmitters"
Trends Neurosci. 6, 325-333

35 Miller, R.J. (1980)
"Opiate receptors and their endogenous ligands"
wie Ref. 4, 309-330

36 Teichberg, V.I., Blumberg, S. (1980)
"Substance P receptors"
wie Ref. 4, 397-403

37 Marx, J.L. (1979)
"Brain peptides: Is Substance P a transmitter of pain signals?"
Science 205, 886-889

38 Sejnowski, T.J. (1982)
"Peptidergic synaptic transmission in sympathetic ganglia"
Fed. Proc. 41, 2923-2928

39 Quirion, R., Shults, C.W., Moody, T.W., Pert, C.B., Chase, T.N., O'Donohue, T.L. (1983)
"Autoradiographic distribution of Substance P receptors in rat central nervous system"
Nature 303, 714-716

40 Otsuka, M., Konishi, S. (1983)
"Substance P - the first peptide neurotransmitter?"
Trends Neurosci. 6, 317-320

41 Stallcup, W.B., Patrick, J. (1980)
"Substance P enhances cholinergic receptor desensitisation in a clonal nerve cell line"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 634-638

42 Whittaker, V.P., Barker, L.A. (1972)
"The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles"
In: "Methods of Neurochemistry" (Fried, R., Hrsg.)
Vol. 2, 1-52
Marcel Dekker, New York

43 Fels, G., Wolff, E.K., Maelicke, A. (1982)
"Equilibrium binding of acetylcholine of the membrane-bound acetylcholine receptor"
Eur. J. Biochem. 127, 31-38

44 Schiebler, W. Lauffer, L., Hucho, F. (1977)
"Acetylcholine receptor enriched membranes: Acetylcholine binding and excitability after reduction in vitro"
FEBS Lett. 81, 39-42

45 Bennett Jr., J.P. (1978)
"Methods in binding studies"
In: "Neurotransmitter Receptor Binding" (Yamamura, H.I., Enna, S.J., Kuhar, M.J., Hrsg.) 57-90
Raven Press, New York

46 Levitzki, A. (1980)
"Quantitative aspects of ligand binding to receptors"
wie Ref. 4, 9-28

47 Burt, D.R. (1978)
"Criteria for receptor identification"
wie Ref. 45, 41-55

48 Yamamura, H.I. (1978)
"Other uses of neurotransmitter receptor binding assays"
wie Ref. 45, 171-185

49 Nordberg, A. Larsson, C. (1980)
"Studies of muscarinic and nicotinic binding sites in brain"
Acta Physiol. Scand. 479, 19-23

50 Gavish, M., Sokolovsky, M. (1982)
"Solubilization of muscarinic acetylcholine receptor by zwitterionic detergent from rat brain cortex"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 819-824

51 Bauer, K. (1983)
"Role of proteolytic enzymes in neuropeptide metabolism"
In: "Multihormonal regulations in neuroendocrine cells" (Tixier-Vidal, A., Richard, P., Hrsg.) 475-492
Inserm, Paris

52 Lee, C.M., Sandberg, B.E.B., Hanley, M.R., Iversen, L.L. (1981)
"Purification and characterization of a membrane-bound Substance P - degrading enzyme from human brain"
Eur. J. Biochem. 114, 315-327

53 Bauer, Karl
Max-Volmer-Institut, Abt. Biochemie, TU Berlin

54 Lee, C.M., Javitch, J.A., Snyder, S.H. (1983)
"[^{3}H]Substance P binding to salivary gland membranes, regulation by guanyl nucleotides and divalent cations"
Mol. Pharmacol. 23, 563-569

55 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275

56 Schiebler, W. Hucho, F. (1978)
Eur. J. Biochem. 85, 55-63

Lebenslauf

- Geboren am 1.2.1943 in Bromberg als Tochter des Kammermusikers Kurt Leipert und seiner Ehefrau Hildegard geb. Kupfer.
- 1949 - 1959 Grundschule und Raabe-Gymnasium in Braunschweig, Abschluß Untersekunda.
- 1959 - 1962 Berufsfachklasse 'Mode und Modeillustration' des Lette-Vereins Berlin (Berufsziel: Kostümbildnerin).
- 1962 - 1969 Eheschließung mit dem Maler und Graphiker Bernd Reulecke, Geburt des Sohnes Felix, Scheidung.
- 1968 - 1976 Berufstätigkeit als Sekretärin und Sachbearbeiterin.
- 1975 - 1978 Berlin-Kolleg, Abitur Juni 1978, Großes Latinum September 1978 am Arndt-Gymnasium in Berlin.
- Herbst 1978 bis Herbst 1984 Studium der Humanmedizin, davon Herbst 1978 bis Januar 1984 an der Freien Universität in Berlin, ab Februar 1984 in Heidelberg, Staatsexamen Herbst 1984 in Heidelberg.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353